

**Regulación de la expresión génica mediada por el tallo
ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Doctorando: Jesús Revuelta Cervantes
Director de Tesis: Miguel Remacha Moreno

**Regulación de la expresión génica mediada por el tallo
ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.**

A mis padres.

A Anna, *in memoriam*.

Llegó el momento de los agradecimientos a todas las personas que han hecho posible que haya escrito mi tesis doctoral. En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis padres por su ejemplo, su preocupación, su entrega, su cariño y su cuidado, por no escatimar ni un segundo de su tiempo ni una de las antiguas pesetas para procurarme la mejor educación y formación posibles, que me han hecho como soy, capaz no sólo de escribir una tesis. También quiero extender estos agradecimientos a mi familia, un poco más grande desde hace unos añitos, y a todos los que forman parte de ella más allá de lo que indican los apellidos (Nono, Geli, Mamen, Loli, Manolo, y tanto otros).

A los doctores Miguel Remacha Moreno, por su dirección durante estos años y las pacientes e inagotables correcciones que han dado forma, o casi se podría decir que forjado, esta tesis, y Juan Pedro García Ballesta por recibirme en su laboratorio, por sus consejos y su cercanía.

A los habitantes del antiguo CV310, de los que tan buena acogida recibí al llegar, y que se hizo poco menos que imprescindible para trabajar con alegría e ilusión a lo largo de las largas jornadas que echábamos en el laboratorio. Gracias a Jorge e Isa, Alberto y Petri, por la amistad (*"Piensa que cuando tienes amigos tienes un tesoro", Menandros*) y los buenos (y tan necesarios) momentos dentro y fuera del laboratorio; sin olvidar, por supuesto, a Cruz, Verónica y Deyi, partícipes en tan estupenda bienvenida. Gracias a todos.

A los integrantes que fueron llegando después y que han formado parte este laboratorio, el 310, independientemente del edificio en el que se ubique. Gracias a todos los compañeros, estudiantes y demás gente que han pasado por el labo, de los que siempre se aprende algo y que se han portado como amigos (*"Por sus obras los conoceréis", Mt 7:20*), que para no convertirlos en una apretada lista de nombres al estilo acostumbrado de Rubén Chirri, resumiré en el primero y última: de David a Lidia.

Gracias al resto de amigos y otras gentes del CBMSO, en especial a los de los laboratorios 303, 302 y 121 por los préstamos, regalos, ayuda, etc., pero sobre todo por el "pasilleo", la vida más allá de la ciencia y muchas otras cosas, y 311, mi "laboratorio de acogida", por hacerme sentir rodeado de amigos, por las amenas sobremesas, por vuestra simpatía. Y ya que estamos, a todos los *juergueistas* de estos y otros muchos laboratorios, así como a corredores y forofos/as del fútbol y otros deportes, por aportar innumerables momentos de esparcimiento y diversión con los que reponer fuerzas para volver al labo con las energías necesarias.

A todos los trabajadores de departamentos de servicio del CBM, como mantenimiento, instrumentación, limpieza, administración y otros que seguro estoy dejándome en el tintero (o mejor dicho teclado), sin los que hubiese sido imposible investigar.

A Vanesa, mi reina de ajedrez. Gracias por todo. VALE.

Si...

Eres objeto de engaños y no pagas con mentiras,
o siendo odiado, no respondes con odio.

[...]

Si soportas escuchar la verdad que has dicho,
tergiversada por truhanes para atrapar a necios.
Si puedes encontrarte con la Victoria y el Fracaso,
y tratas a ambos de la misma manera

[...]

serás un hombre, hijo mío.

"If", Rudyard Kipling

ÍNDICE

Índice general.	III
<i>Índice de figuras.</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de tablas.</i>	<i>VIII</i>
 0. SUMMARY.	 3
 I. INTRODUCCIÓN.	 7
I.1. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .	9
I.1.1. TRADUCCIÓN.	9
I.1.1.1. Traducción en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	9
I.1.1.2. Iniciación.	9
I.1.1.3. Elongación.	10
I.1.1.4. Terminación.	11
I.1.1.5. Regulación de la traducción.	11
I.1.2. EL RIBOSOMA.	12
I.1.2.1. El ribosoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	12
I.1.2.2. Polisomas.	13
I.1.3. EL TALLO RIBOSÓMICO.	14
I.1.3.1. El tallo ribosómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	14
I.1.3.2. La proteína P0.	14
I.1.3.3. Las proteínas ácidas.	15
I.1.3.4. El tallo ribosómico como elemento regulador de la traducción.	16
I.2. MICROARRAYS.	17
I.2.1. EL BIOCHIP O MICROARRAY.	17
I.2.1.1. Microarrays de cDNA.	18
I.2.1.2. Oligoarrays.	18
I.2.2. LA SUPERFICIE.	18
I.2.2.1. Superficies de aminas.	18
I.2.2.2. Superficies aldehído.	18
I.2.3. LA IMPRESIÓN.	18
I.2.4. EL MARCAJE DE LAS SONDAS.	19
I.2.4.1. Marcaje directo.	19
I.2.4.2. Marcaje indirecto.	20
I.2.5. LA HIBRIDACIÓN.	20
I.2.6. LAS IMÁGENES.	21
I.2.6.1. Adquisición de imágenes.	21

I.2.6.2. Análisis de imágenes y obtención de datos.	21
I.2.7. LOS DATOS.	22
I.2.7.1. Estructura de los datos.	22
I.2.7.2. Análisis de los datos.	23
I.2.8. LOS RESULTADOS.	25
I.2.9. APLICACIONES DE LA EXPERIMENTACIÓN CON BIOCHIPS.	26
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	27
II.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	29
II.1.1. CEPAS DE MICROORGANISMOS.	29
II.1.1.1. Bacterias.	29
II.1.1.2. Levaduras.	29
II.1.2. MEDIOS DE CULTIVO.	30
II.1.2.1. Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .	30
II.1.2.2. Medios de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	30
II.1.3. PLÁSMIDOS.	30
II.1.4. OLIGONUCLEÓTIDOS.	31
II.2. MÉTODOS.	31
II.2.1. MICROSCOPIA.	31
II.2.2. TRANSFORMACIÓN CELULAR.	32
II.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> .	32
II.2.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	32
II.2.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	32
II.2.3.1. Obtención de DNA plasmídico de bacteria.	32
II.2.3.2. Obtención de RNA total de levadura.	32
II.2.3.3. Obtención de mRNA asociado a polirribosomas de levadura.	32
II.2.4. OBTENCIÓN DE DIFERENTES FRACCIONES CELULARES DE LEVADURA.	33
II.2.4.1. Obtención de la fracción S30.	33
II.2.4.2. Lavado salino de ribosomas (RSW).	33
II.2.4.3. Análisis de perfiles de polisomas en gradiente de sacarosa.	34
II.2.4.4. Purificación de ribosomas por cromatografía de afinidad.	34
II.2.5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.	35
II.2.5.1. Electroforesis de ácidos nucleicos.	35
II.2.5.2. SDS-PAGE.	35
II.2.5.3. Electroforesis bidimensional.	35
II.2.5.3.1. Isoelectroenfoque. Primera dimensión.	35
II.2.5.3.2. SDS-PAGE. Segunda dimensión.	36

II.2.6. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA.	36
II.2.7. HIBRIDACIÓN EN MICROARRAYS.	37
II.2.7.1. Oligoarrays.	37
II.2.7.2. Microarrays de cDNA.	38
II.2.7.3. Obtención y análisis de imágenes.	39
II.2.7.4. Análisis de datos.	39
II.2.7.5. Microarrays de Affymetrix.	40
II.2.8. QRTPCR.	40
II.3. SOPORTE INFORMÁTICO.	41
II.3.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.	41
II.3.1.1. Obtención y análisis de datos.	41
II.3.1.2. Bioinformática.	41
II.3.1.3. Tratamiento de imágenes.	41
II.3.2. HERRAMIENTAS EN INTERNET.	42
III. OBJETIVOS.	43
IV. RESULTADOS.	47
IV.1. REGULACIÓN DIFERENCIAL EN MUTANTES EN EL TALLO RIBOSÓMICO.	49
IV.1.1. HIBRIDACIÓN EN OLIGOARRAYS YEAST GENELIST V1.1.2.	50
IV.1.1.1. Análisis de imágenes de oligoarrays.	50
IV.1.1.2. Obtención de datos de oligoarrays.	51
IV.1.1.3. Análisis de datos de oligoarrays.	53
IV.1.1.4. Análisis con almaZen.	62
IV.1.2. HIBRIDACIÓN EN OTROS SISTEMAS DE MICROARRAYS.	62
IV.1.2.1. Microarrays de cDNA.	62
IV.1.2.2. Microarrays de Affymetrix.	64
IV.1.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TODAS LA PLATAFORMAS.	64
IV.1.4. VALIDACIÓN DE DATOS DE MICROARRAYS MEDIANTE QRTPCR.	68
IV.1.4.1. Validación mediante QRTPCR.	68
IV.1.4.2. Validación y comparación de los sistemas empleados.	69
IV.1.5. mRNAs TRADUCIDOS DIFERENCIALMENTE ENTRE D4567 Y W303.	70
IV.1.5.1. Patrones estructurales en los mRNAs de genes regulados.	73
IV.1.6. Expresión y regulación diferencial en mutantes dobles.	73
IV.1.7. METABOLISMO DEL FOSFATO.	77
IV.1.8. ESTUDIOS MITOCONDRIALES.	77
IV.1.8.1. Morfología y distribución de mitocondrias.	78

IV.1.8.2. Expresión de proteínas mitocondriales identificadas.	78
IV.1.8.3. Perfiles de polisomas de cepas <i>gran</i> y <i>petite</i> de W303 y D4567.	79
IV.2. CARACTERIZACIÓN DE PERFILES DE POLISOMAS.	80
IV.2.1. GRADIENTES CONTINUOS DE SACAROSA.	81
IV.2.2. GRADIENTES DE DISOCIACIÓN.	84
IV.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS AL RIBOSOMA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	85
IV.3.1. GRADIENTES PREPARATIVOS.	85
IV.3.2. PURIFICACIÓN DE RIBOSOMAS CON EL EPÍTOPO TAP.	85
IV.3.3. LAVADO SALINO DE RIBOSOMAS (RSW).	87
IV.3.3.1. Western-blot de factores asociados a ribosoma.	88
IV.3.3.2. Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional.	88
V. DISCUSIÓN.	91
V.1. PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN/TRADUCCIÓN DE MUTANTES DEFICIENTES EN EL TALLO RIBOSÓMICO.	93
V.1.1. Comparación de las plataformas de microarrays.	93
V.1.2. Expresión diferencial en D4567 vs. W303.	94
V.1.2.1. Genes de procesos metabólicos.	94
V.1.2.1.1. Regulón PHO.	94
V.1.2.1.2. Regulón MET.	95
V.1.2.1.3. Enzima CK2.	96
V.1.2.2. Genes mitocondriales y de respuesta a estrés.	97
V.1.3. Regulación traduccional de la expresión génica de D4567.	98
V.1.4. EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DIFERENCIAL EN D46 Y D57.	100
V.2. PROTEÍNAS ASOCIADAS DIFERENCIALMENTE A RIBOSOMAS DE W303 Y D4567.	100
V.2.1. Factor de elongación de la traducción eEF2.	100
V.2.2. Proteína Stm1p.	101
V.2.3. Proteína Ssb1p.	102
V.3. EFECTOS SOBRE ESTRUCTURAS POLISÓMICAS.	102
VI. CONCLUSIONES.	105
VII. BIBLIOGRAFÍA.	109
VIII. ABREVIATURAS.	123
IX. APÉNDICES.	CD-ROM - 127

Índice de figuras.

Figura 1.1. Estructura del ribosoma por cryo-EM.	13
Figura 1.2. Modelo de regulación de la traducción.	17
Figura 1.3. Estructura de un nucleótido aminoalil-UTP.	19
Figura 1.4. Nucleótidos fluorescentes.	20
Figura 1.5. Gráfico RI-MA.	23
Figura 4.1. Perfiles de polisomas en gradientes continuos de sacarosa.	50
Figura 4.2. RI-MA plots.	51
Figura 4.3. Resultados del análisis del transcriptoma.	52
Figura 4.4. Resultados del análisis del traductoma.	52
Figura 4.5. Resultados del análisis de transcriptoma de D4567 frente a W303 en biochips de cDNA.	63
Figura 4.6. Resultados del análisis de traductoma de D4567 frente a W303 en biochips de cDNA.	63
Figura 4.7. QRT-PCR D4567/W303.	69
Figura 4.8. Comparación de microarrays y QRT-PCR.	70
Figura 4.9. Crecimiento a diferentes concentraciones de fosfato.	77
Figura 4.10. Mitocondrias fluorescentes.	78
Figura 4.11. Western-blot de fracciones celulares S30 de W303 y D4567.	79
Figura 4.12. Perfiles de polisomas en gradiente continuo de sacarosa de 10%-50%.	80
Figura 4.13. Perfiles de polisomas en gradiente continuo de sacarosa de 10%-50% de todas las cepas mutantes en proteínas ácidas.	82
Figura 4.14. Perfiles de disociación.	84
Figura 4.15. Epítipo TAP.	87
Figura 4.16. Purificación por TAP.	87
Figura 4.17. Factor eEF2.	88
Figura 4.18. Gel bidimensional de W303.	89
Figura 4.19. Gel bidimensional de D4567.	89

Índice de tablas.

Tabla 2.1. Cepa de <i>E.coli</i> empleada.	29
Tabla 2.2. Cepas de <i>S.cerevisiae</i> empleadas.	29
Tabla 2.3. Plásmidos empleados en las transformaciones de levaduras.	30
Tabla 2.4. Oligonucleótidos empleados.	31
Tabla 2.5. Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados en Western-blot.	37
Tabla 4.1. Genes con variación significativa en su expresión entre las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 y D4567.	53
Tabla 4.2. Genes de localización mitocondrial que se expresan de forma diferencial en D4567 con respecto a W303.	54
Tabla 4.3. Genes implicados en procesos de respuesta a estrés que se expresan de forma diferencial en el mutante D4567 con respecto a W303.	54
Tabla 4.4. Genes reguladores que varían diferencialmente su expresión en el mutante D4567 respecto a W303.	56
Tabla 4.5. Genes implicados en procesos de transporte que se expresan diferencialmente en el mutante D4567 con respecto a W303.	56
Tabla 4.6. Genes sin función conocida que muestran expresión diferencial en el mutante.	57
Tabla 4.7. Genes reguladores de la ruta metabólica del fosfato.	57
Tabla 4.8. Efectos represores de la expresión génica en D4567 debidos a la ausencia de proteínas ácidas.	59
Tabla 4.9. Regulación traduccional diferencial en D4567.	61
Tabla 4.10. Estadística general de microarrays (I).	65
Tabla 4.11. Estadística general de microarrays (II).	65
Tabla 4.12. Genes inducidos en todas las plataformas.	65
Tabla 4.13. Genes reprimidos en todas las plataformas.	66
Tabla 4.14. QRTPCR de D4567/W303.	69
Tabla 4.15. Comparación de microarrays y QRTPCR.	70
Tabla 4.16. Regulación diferencial en traducción.	71
Tabla 4.17. Expresión diferencial en dobles mutantes.	74
Tabla 4.18. Comparación de la regulación diferencial en mutantes.	76
Tabla 4.19. Densitometrías.	79
Tabla 4.20. Cuantificación de la relación entre diferentes estructuras ribosómicas.	83
Tabla 4.21. Proteínas asociadas de forma diferencial a ribosomas de W303 y D4567.	90

**Regulación de la expresión génica mediada por el tallo
ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.**



0. Summary.

Thesis jacta est.
Cayo Julio César, adaptación.

The stalk is an essential, evolutionary conserved and very dynamic structure located in the ribosomal large subunit at the entrance of the peptidic tunnel. The ribosomal stalk of *Saccharomyces cerevisiae* is composed of four acid phosphoproteins (P1 α , P1 β , P2 α , P2 β) with an average molecular weight of 11 kDa, that form a pentamer along with another protein called P0, larger (33.7 kDa) and essential for cell viability. The stalk is involved in interactions between ribosomes and soluble translational factors. No further functions are known, except that the pattern of expressed proteins varies depending on differences in its protein composition. It is possible that these differences in protein expression pattern were caused by one or more affected transcriptional or translational regulator/s. Following this way, in the present Thesis, hybridization to microarrays technology and other approaches were employed in order to take evidence about this putative regulation mechanism over mRNAs translation. Increasing in number of mRNAs molecules associated to translational activated ribosomes, founded in polirribosomal structures, in mutant strains was looked for. In other words, we were looking for genes better transcribed in mutant or in wild type (those worse transcribed in mutant) that change their behaviour in translation. In fact, only a little number of genes seemed to show differences in their expression status between transcription and translation (i.e. Overexpressed genes in transcription in the mutant that not appeared overexpressed in translation in wild type, or *viceversa*). In deed, data obtained employing different microarray platforms and methodologies were unable to yield the desired result because techniques fail in sensitivity.

However, I have found out effects in the regulation of phosphate and methionine metabolism pathways as well as in the expression of a set of apparently disjointed genes involved in gene expression regulation, transport, mitochondrial and response to stress, as more representative of those sets. In this way, both metabolism pathways were found downregulated else their own regulators in the mutant, while transporters, response to stress, and mitochondrial-related genes appeared spreaded by all clasiffication clusters. Actually, these groups of genes are not isolated, existing functional connections beetwen them: genes which respond to stress, regulate transcription by binding to DNA and they are located in mitochondria; or genes associated to mitochondria and involved in thermal stress response by affecting tRNA maduration.

Other experiments showed results that allowed us to unveil any kind of involvement of the acid proteins in the mechanisms of ribosomal subunits joining and their biosynthesis, by unbalancing the 60S/40S ratio in mutants which were defective in the whole or a subset of these four acid proteins. This should occur at different level depending on stalk composition of those strains. These unexpected results point towards possible effects or regulation mecanism of acid phosphoproteins in the ribosomal stalk over the own ribosomal assembly and subunit interactions that had not been previously described.



I. Introducción.

*A U G: metionina.
El código genético.*

I.1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

Saccharomyces cerevisiae es un organismo eucariota unicelular usado ampliamente como organismo modelo en estudios de laboratorio debido a que presenta ciertas características ventajosas a la hora de realizar estudios genéticos y bioquímicos. Esta levadura es un microorganismo que crece rápidamente, es fácil de cultivar empleando medios de cultivo relativamente sencillos y versátil por su condición de anaerobio facultativo. El ciclo celular comprende una fase de crecimiento vegetativo asexual, común a individuos de diferente ploidía, en la que se reproducen por gemación. Las levaduras haploides presentan un tipo sexual, que puede ser α o σ , y que permite que respondan a las hormonas sexuales secretadas por el tipo opuesto, conjugando y originando un individuo diploide. Esta condición haploide se aprovecha para el estudio de funciones génicas mediante mutaciones y deleciones. Las células diploides no producen hormonas ni responden a las mismas y pueden esporular formando cuatro ascosporas, tras un proceso de meiosis, que al germinar darán lugar a individuos haploides con genotipos diferentes a los de las células parentales, lo que las hace muy útiles a la hora de obtener cruzamientos entre cepas.

Otra característica valiosa como organismo modelo para eucariotas es la menor complejidad tanto del propio organismo como de su genoma, que apenas posee intrones, manteniendo un alto grado de conservación en mecanismos celulares básicos entre los que se encuentran la replicación, la transcripción y la traducción.

I.1.1. LA TRADUCCIÓN.

La traducción es el proceso mediante el cual la información genética codificada en RNA mensajeros (mRNA) es expresada como proteínas. Es un proceso esencial estrechamente relacionado con el estado fisiológico de la célula, y tanto los elementos implicados como las distintas etapas en que se divide muestran un alto grado de conservación a lo largo de la evolución y por tanto son ubicuas en todos los organismos (93, 102).

I.1.1.1. Traducción en *Saccharomyces cerevisiae*.

La traducción en *Saccharomyces cerevisiae* no difiere esencialmente de la de otros organismos (30, 69, 104). Se pueden establecer tres fases en el proceso general de biosíntesis de proteínas: iniciación, elongación y terminación. En cada fase intervienen factores solubles que cumplen funciones específicas necesarias para alcanzar los niveles requeridos de rapidez y exactitud (90, 103) esenciales para la viabilidad celular.

I.1.1.2. Iniciación.

La iniciación es el proceso mediante el cual comienza la traducción del RNA mensajero. Se desarrolla en varias etapas en las que intervienen varios factores (90, 101, 127, 170): la

subunidad 40S se asocia a los factores de iniciación eIF1, eIF3, eIF5 y eIF1A y al complejo ternario compuesto por un RNA de transferencia Met-tRNA^{MET}, GTP y el factor de iniciación eIF2, para formar el complejo de preiniciación 43S, y el RNA mensajero se asocia con los factores de iniciación eIF4F y eIF4B a través del CAP, estructura 5' terminal formada por una modificación posttranscripcional de nucleótidos de guanina (149, 150). La asociación del complejo 43S y el mensajero se produce por la interacción con estos factores y la unión a una zona cercana al extremo de éste. Tras esto, el complejo 43S se desplaza por el mensajero en dirección 3' hasta el primer codón de inicio que se encuentre en un entorno adecuado, en lo que se conoce como *scanning* (85). Una vez en este punto, los factores eIF5 catalizan la hidrólisis de eIF2-GTP y se liberan los factores unidos, con la participación de eIF5B, que también posee actividad GTPasa y es esencial para la asociación de la subunidad 60S. Una subunidad 60S se asocia para formar un ribosoma activo 80S.

I.1.1.3. Elongación.

La elongación (revisada en (173, 197)) es el proceso mediante el cual se forma la cadena polipeptídica que compondrá la proteína traducida a partir del RNA mensajero. Se distinguen tres etapas: Unión del tRNA cargado, formación del enlace peptídico, y traslocación.

El tRNA cargado con el aminoácido correspondiente (160) se une al sitio A del ribosoma según la complementariedad entre el codón del mensajero y el anticodón del propio tRNA, con la intervención del factor de elongación eEF1A-GTP (106), mediante la formación de un complejo ternario entre dicho tRNA y un complejo binario de eEF1 α y GTP.

La formación del enlace peptídico es un proceso clave en la síntesis de proteínas. La catálisis ocurre en el centro peptidil transferasa, entre el extremo 3'-CCA del tRNA unido al sitio A y el carboxilo del último péptido incorporado a la cadena naciente situado en el sitio P (144), sin que se conozca la intervención de ningún factor (17). Este proceso conlleva la transferencia de la totalidad del péptido en formación al aminoácido portado por el tRNA en el sitio A, quedando el tRNA descargado en el sitio P.

La traslocación es el proceso de desplazamiento del ribosoma por la molécula del RNA mensajero hacia el 3'. Está mediada por un cambio de conformación del factor de elongación eEF2 (177), asociado a la hidrólisis de GTP (143) y provoca el desplazamiento relativo del péptido naciente hacia el sitio P y del tRNA descargado hasta el sitio E de salida (196), quedando el sitio A libre para aceptar un nuevo tRNA cargado (30).

Saccharomyces cerevisiae, posee un tercer factor de elongación eEF3, con actividad ATPasa, exclusivo de algunos hongos y ausente en el resto de organismos conocidos (180). Tiene carácter esencial y es necesario en cada ciclo de elongación pero no interviene directamente en la formación del enlace peptídico ni en la traslocación, aunque la

estimula en ausencia de eEF2. Se localiza asociado a estructuras polisómicas, en menor medida a monosomas y ausente en subunidades (72). Su función parece estar relacionada con la fidelidad (128) puesto que favorece específicamente la unión de complejos EF1 α -tRNA-Aa con el reconocimiento correcto entre tRNA y aminoácido (4, 84).

I.1.1.4. Terminación

La terminación (81) es el proceso de liberación de la cadena peptídica por hidrólisis del enlace con el tRNA, catalizada por los factores de terminación eRFs (74). Ocurre cuando el ribosoma alcanza uno de los tres codones de parada (UAA, UAG, UGA), que indican el final de la ORF codificada en el mensajero (100, 152).

I.1.1.5. Regulación de la traducción.

El concepto de regulación traduccional (77, 103) implica cualquier efecto ocurrido en la traducción que causa un cambio en la cantidad de proteína completa producida por unidad de mRNA (48). La traducción está sometida a un control y una regulación muy finos, como es de esperar en un proceso de suma importancia por su complejidad y el coste energético que supone para la célula. En eucariotas está regulada por diversos mecanismos en todas las fases descritas. La iniciación se regula por elementos estructurales en la región 5'UTR del mensajero (95), por uORFs (190), modulación mediante fosforilación de la actividad de los factores que colaboran en la formación del complejo de preiniciación y su ubicación sobre el mensajero (103), la estabilidad del CAP (93), etc.

El control de la terminación también puede regular la traducción (194), modificando la velocidad con que los ribosomas y subunidades pasan a estar disponibles para el reciclado, la eficacia en la supresión de codones de parada, etc... Estos mecanismos de regulación han sido estudiados por diferentes autores y aproximaciones en varios organismos eucariotas y procariotas, lográndose importantes avances en determinados casos (103). El estudio de mecanismos de regulación de la elongación se centran sobre todo en el control de la actividad de los factores implicados (eEF1A y eEF2), sobre los que recaería toda la función de control (128). La elongación es un paso intermedio de un proceso (traducción), lo que la convierte en poco susceptible de ser un punto de control. Sin embargo, la regulación a nivel de traducción y particularmente la elongación es ventajosa con respecto a la transcripción en el caso de genes y mensajeros de gran tamaño o de los que se requiera cierta inmediatez en la respuesta a estímulos. La regulación de eEF1A y eEF2 se lleva a cabo mediante fosforilaciones que disminuyen la actividad del factor y a través de la cantidad de mensajero traducido. Se sabe que la fosforilación de eEF1A ralentiza la traducción aumentando la fidelidad y disminuyendo el consumo de moléculas energéticas que quedan disponibles para su utilización en otros procesos celulares. La fosforilación de eEF2 se realiza por una quinasa de eEF2 presente

en mamíferos y otros organismos, que no ha sido identificada en *Saccharomyces cerevisiae*. Existen pocos estudios sobre la fosforilación de eEF2 y no hay información sobre su papel regulador *in vivo* aunque se han descrito efectos reguladores en condiciones de anoxia, estrés osmótico y de respuesta a glucagón, insulina y privación de glucosa o aminoácidos (192), que parecen ejercer efectos en dicha fosforilación inhibiendo la actividad del factor.

I.1.2. EL RIBOSOMA.

El ribosoma, uno de los componentes mayoritarios de la célula, es una partícula ribonucleoproteica cuyo RNA (rRNA) representa los 2/3 de la masa del ribosoma y llega a constituir el 60% del RNA celular. Los ribosomas están constituidos por dos subunidades que se ensamblan en el citoplasma para llevar a cabo el proceso de traducción. En eucariotas, las subunidades menor y mayor tienen coeficientes de sedimentación de 40S y 60S respectivamente, y los ribosomas completos, 80S. La estructura del ribosoma es muy similar en arqueas, bacterias y eucariotas (114). Se consideran proteínas ribosómicas las que permanecen unidas a la partícula ribonucleoproteica tras someterla a lavado con alta concentración de sales (KCl 0,5M o NH₄Cl 0,5M).

I.1.2.1. El ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

La subunidad 40S está constituida por 32 proteínas y una molécula de RNA ribosómico de 1798 nucleótidos y coeficiente de sedimentación 18S y la subunidad mayor con 45 proteínas y tres moléculas de rRNA de 3392 nucleótidos (25S), 158 nucleótidos (5,8S) y 121 (5S) (123).

En general todas las proteínas del ribosoma están en contacto por al menos un dominio con los rRNA, que se disponen a modo de andamios. La mayoría de proteínas ribosómicas presentan estructura secundaria y terciaria en determinadas regiones, y zonas más flexibles y desestructuradas que corresponden a los sitios de unión al rRNA que se estructuran al incorporarse al ribosoma (12). Su función principal es la de estabilizar el rRNA con el que interaccionan, y casi todas las estudiadas son esenciales (200).

Se ha obtenido un modelo del ribosoma de *S. cerevisiae* por técnicas de criomicroscopía electrónica (figura 1.1, (52, 172)) que sugiere cierta conservación de los ribosomas a lo largo de la evolución, con la interacción entre las dos subunidades similar a la que se observa en otros organismos. La forma general del ribosoma es asimétrica aunque la región que incluye y rodea al centro peptidil transferasa sí es simétrica (16).

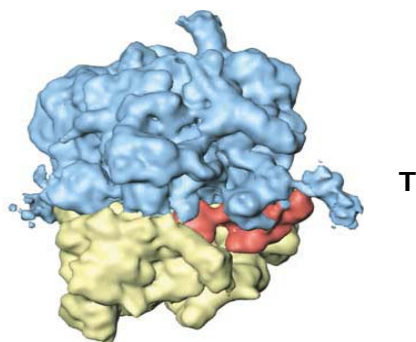


Figura 1.1. Estructura del ribosoma por cryo-EM, resolución 11.7 Å. La subunidad 40S se muestra en amarillo, la 60S en azul y el factor eEF2 en rojo. T: Tallo ribosómico. Tomado de (172)

I.1.2.2. Polisomas.

Los polisomas son estructuras originadas en la traducción activa de un mensajero debido a la presencia de más de un ribosoma asociado a él. De forma convencional, la presencia de polirribosomas en un extracto celular puede observarse mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa (193). Se puede considerar que los mensajeros asociados a estas estructuras están siendo traducidos activamente por la célula. El número de ribosomas asociados a un mensajero al mismo tiempo depende de parámetros como la longitud del propio mensajero y la velocidad con la que los ribosomas inician, elongan y terminan la traducción (6).

Las características de la distribución de ribosomas a lo largo de un RNA mensajero, son indicativas de alteraciones en las etapas de traducción. La ralentización de la iniciación provocará, para mensajeros con una longitud similar, una disminución del número de ribosomas que muestre asociados, mientras que en alteraciones en la cinética de la elongación, el número de ribosomas asociados aumentará o disminuirá de forma directa a la velocidad de dicho proceso de elongación. Las alteraciones en la procesividad de la traducción o en el paso de terminación afectan a la densidad de ribosomas por número de bases de mensajero en diferentes regiones de la molécula (6). Los efectos sobre el perfil de distribución de ribosomas son aditivos, por lo que las alteraciones en más de una etapa pueden quedar enmascaradas.

En los casos en los que se alteran la iniciación o el ensamblaje de subunidades, se acumulan complejos de preiniciación 48S sobre el mensajero, sin las subunidades 60S asociadas necesarias para completar la iniciación de la traducción, formando *half-meros*: (66) estructuras correspondientes a la mitad de un ribosoma activo.

I.1.3. EL TALLO RIBOSÓMICO.

El tallo ribosómico es una estructura presente en la subunidad 60S del ribosoma maduro (ver figura 1.1). Es ubicua y muy conservada, estando compuesta por una proteína esencial P0 unida al rRNA a la que se unen diferentes fosfoproteínas ácidas, P1 y P2. En su base existe otra proteína, L12 ⁽²⁴⁾ que también forma parte del tallo ribosómico, solapando su lugar de unión al rRNA con el de P0 ⁽²³⁾. De forma general, el tallo está compuesto por dos heterodímeros de proteínas P. La alta flexibilidad del tallo, constatada por su capacidad para interaccionar con proteínas distantes ⁽³⁵⁾, es esencial para la interacción correcta con los factores de traducción. En bacterias se han observado dos conformaciones distintas, una desestructurada con el extremo carboxilo en contacto con el ribosoma y otra extendida con el extremo carboxilo de las proteínas del tallo expuestas al citoplasma ⁽³⁶⁾, que podrían ser alternativas durante la traducción, relacionadas con la función del tallo ribosómico, implicado en el reclutamiento de los factores solubles en el citoplasma y en la actividad GTPasa de éstos una vez unidos al ribosoma ⁽⁶⁵⁾.

I.1.3.1. El tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.

El tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae* es un complejo pentamérico ⁽¹¹⁾ constituido por una copia de P0 a la que se le unen dos heterodímeros de proteínas ácidas de tipo P1 y P2 con fórmula $P0(P1\alpha-P2\beta)(P1\beta-P2\alpha)$ ⁽¹⁷⁸⁾. El tallo es la única estructura del ribosoma cuya actividad está basada en interacciones proteína-proteína sin intervención del rRNA ⁽¹²⁾. Las cinco proteínas P0/P1/P2 poseen un extremo carboxilo muy similar en sus últimos 20 aminoácidos con una secuencia consenso DMGFGFLFD esencial para su función, conteniendo una serina fosforilable ⁽⁹⁾.

I.1.3.2. La proteína P0.

P0 es una proteína esencial de 33 kDa, pI teórico de 4,56 y una longitud de 312 aminoácidos ⁽¹⁵⁶⁾ que se ensambla al ribosoma en el núcleo. El extremo amino está implicado en la interacción con el rRNA durante el ensamblaje de la subunidad 60S y es esencial para su función ⁽¹⁵⁴⁾. La delección de diversos tamaños en la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo de P0 no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento celular cuando las proteínas ácidas están presentes ⁽¹⁵⁵⁾, aunque sí en ausencia de éstas, lo que indica que se necesita al menos un extremo carboxilo para que el ribosoma sea funcional. El dominio de interacción con los dos heterodímeros de proteínas P1/P2, se encuentra en la parte distal del carboxilo de P0.

I.1.3.3. Las proteínas ácidas.

Las proteínas ácidas (llamadas así por su pI ácido entre 3,8 y 4,1) o proteínas P (por estar fosforiladas) son una familia de proteínas muy conservadas evolutivamente, aunque el número de miembros integrantes difiere según el organismo. En *Saccharomyces cerevisiae* están codificadas por cuatro genes independientes, (*RPP1A*, *RPP1B*, *RPP2A* y *RPP2B*) no esenciales (113, 139). Las proteínas ácidas, si bien son similares, presentan diferencias en su secuencia que permiten clasificarlas en dos tipos, P1 y P2, basados en sus homólogos de mamíferos (9), en función del extremo amino de las proteínas, que en las P1 es hidrofóbico y está acetilado (157) mientras que en las P2 es hidrofílico (53), y en la homología de secuencia: las proteínas de tipo P1 tienen una homología del 77%, las P2 en un 80% y en todas el carboxilo comprende el 20% de la proteína.

Todas las proteínas ácidas tienen un tamaño semejante de 12 kDa, y una región central muy flexible rica en alanina y glicina, denominada bisagra, entre los dominios amino y carboxilo. El dominio amino está implicado en la asociación entre ellas y a la región distal del dominio carboxilo de P0 (53, 57, 86, 91, 118), a la que se unen en citoplasma mediante interacciones de estructuras en hélice (55) en un proceso cooperativo (60), mientras que su extremo carboxilo está expuesto al citoplasma e interacciona con los factores solubles (179) eEF2 (171), eIF5A (207), eIF6 (70), y otras proteínas (131). Se sabe que la estructura terciaria de las proteínas P1 α y P2 β es muy flexible, con características de glóbulo fundido, con una posible relevancia fisiológica (210). La interacción de dichas proteínas constituyendo el dímero P1 α -P2 β conlleva un aumento en la estructuración de ambas, sugiriendo una complementación funcional (178). También se conoce la existencia de dímeros P1 β -P2 α asociados al tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dos características adicionales distinguen a las proteínas P del resto de las ribosómicas: la presencia de un reservorio citoplasmático y la capacidad para ser fosforiladas por la subunidad α de la protein-quinasa CK2 (1), estado en el que se encuentran asociadas al ribosoma (10). La fosforilación ocurre sobre un residuo de serina en posición 96 para P1 α , P1 β y P2 α , y en posición 100 para P2 β (205). Se ha descrito la desfosforilación de proteínas ácidas en procesos apoptóticos en *Homo sapiens* (206). El reservorio citoplásmico en el que pueden encontrarse las proteínas P sin fosforilar (9), en niveles de hasta el 75% de toda la presente en la célula (11), permite el intercambio de éstas entre dicho reservorio y los ribosomas. Este hecho ha servido de base para la especulación de que podrían ser adquisiciones evolutivas cuya función es hacer más eficiente la traducción: las proteínas P eran factores que adquirieron la capacidad de unirse al ribosoma para aumentar la eficiencia del sistema.

A diferencia de la proteína P0, las proteínas P1 y P2 no son esenciales, existiendo cepas en las que se han eliminado todas las combinaciones posibles de proteínas P, incluyendo la cepa D4567 en la que se han eliminado todas. La unión a P0 de las

proteínas P1 y P2 es cooperativa, de manera que cualquier combinación de proteínas expresadas en la que existan de dímeros con al menos una proteína de tipo P1 y otra de tipo P2, será capaz de unirse al tallo ribosómico, mientras que en caso contrario el tallo no tendrá asociada ninguna de estas proteínas.

I.1.3.4. El tallo ribosómico como elemento regulador de la traducción.

Se sabe que en una cepa silvestre no todos los ribosomas presentan en el tallo la dotación completa de proteínas ácidas, existiendo poblaciones con diferente composición e incluso sin proteínas P (58). Asimismo, el número de proteínas asociadas a ribosoma no es constante en función del estado fisiológico de la célula (113). El mutante del tallo al que se le han eliminado las cuatro proteínas ácidas (D4567) contiene ribosomas homogéneos sin proteínas P que son funcionales aunque mucho menos eficientes en traducción que uno silvestre (137). La comparación de los extractos de esta cepa con los de una silvestre, así como de las proteínas traducidas *in vitro* en un extracto libre de células, mostraba patrones proteicos claramente diferentes, lo que parecía indicar que algunos mensajeros podrían traducirse únicamente, o al menos eran traducidos con más eficiencia, por ribosomas cuyo tallo no tiene proteínas P1/P2, mientras que otros mRNAs eran traducidos por estos ribosomas más difícilmente. Se han descrito diferencias fenotípicas en estos mutantes sin proteínas P asociadas a tallo, que son inviables a 37°C y sensibles a concentraciones moderadas de sal, pero capaces de crecer a esta temperatura si se aumenta la concentración de sales en el medio de crecimiento, y son capaces de conjugarse pero no esporular, entre otras características.

Las cuatro proteínas ácidas se encuentran en cantidades equivalentes cuando se considera la población global de ribosomas (141), y puesto que no existen más de cuatro copias de proteínas P por ribosoma (151), y éstas no aparecen constituyendo homodímeros en el ribosoma de la levadura (57), se ha propuesto un modelo de estructura del tallo ribosómico en *Saccharomyces cerevisiae* en el que éste se considera heterogéneo y compuesto por dos heterodímeros de proteínas ácidas. Por tanto, existirían diferentes poblaciones de ribosomas con distinta composición del tallo (58), donde el intercambio de proteínas ácidas entre citoplasma y ribosoma podría regular la eficiencia de traducción (105, 208).

Se propuso un mecanismo regulador de la traducción (9) (figura 1.2) que establece que las diferentes poblaciones de ribosomas traducen determinados mRNA con desigual eficiencia. A consecuencia de esta desigualdad el patrón de proteínas traducidas dependerá de la proporción relativa de las subpoblaciones. La existencia de este conjunto de mensajeros posiblemente regulados de forma diferencial debido a determinadas características de su molécula aun no ha sido confirmada, lo que se intentará a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo.

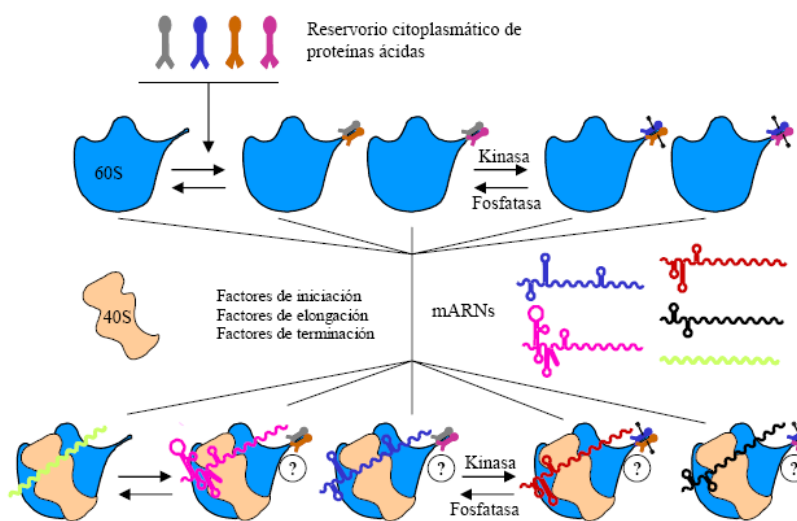


Figura 1.2. Modelo de regulación de la traducción. El ribosoma muestra diferente afinidad por determinados tipos de mensajero según las proteínas ácidas presentes en el tallo.

I.2. MICROARRAYS

La tecnología empleada en la experimentación con biochips o microarrays es relativamente moderna, puesto que se desarrolló a mediados de los años 90 del siglo pasado (97, 159). Se basa en una metodología y unas técnicas bien conocidas en disciplinas como Biología Molecular (estructura de los ácidos nucleicos y las hibridaciones entre moléculas), Bioquímica (DNA polimerasa, RNA polimerasa y síntesis artificial de oligonucleótidos), Química (química de silanos y moléculas fluorescente), Física (tratamiento de superficies e interacciones), Matemáticas (modelos de análisis de datos), Informática (tratamiento de imágenes y capacidad de cálculo) y Robótica (técnicas de microimpresión), cuyo desarrollo en la segunda mitad del siglo XX han posibilitado la aparición de esta nueva tecnología.

I.2.1. EL BIOCHIP O MICROARRAY.

Un microarray, o biochip, es una matriz ordenada de elementos microscópicos (*spots o features*) en una superficie plana, que permite la unión específica de genes o productos génicos (158). Existen varios tipos de biochips, según la naturaleza de estos elementos microscópicos: ácidos nucleicos, proteínas, células o tejidos. Los biochips de ácidos nucleicos se clasifican en dos tipos: microarrays de cDNA y de oligonucleótidos (oligoarrays). La nomenclatura de los componentes biológicos presenta discrepancias a la hora de referirse a la sonda o la muestra. Dependiendo de autor el RNA o cDNA marcado obtenido a partir de una fuente biológica, que será hibridado en el biochip, recibe el

nombre de muestra mientras que la molécula impresa en el biochip recibe el nombre de sonda (18), o al contrario, denominando sonda a la molécula marcada y muestra a la impresa en el biochip (8, 134, 158). En este trabajo utilizaremos esta última terminología.

I.2.1.1. Microarrays de cDNA: Están formados por productos de PCR derivados de RNA mensajero, que se sintetizan *in vitro* empleando técnicas convencionales de Biología Molecular y posteriormente se depositan sobre la superficie del biochip.

I.2.1.2. Oligoarrays: Están formados por oligonucleótidos sintéticos, de 15 a 70 mer. Estos dispositivos se pueden fabricar sintetizándose oligonucleótidos *in situ*, sobre la superficie del biochip añadiendo base tras base (*Affymetrix*) hasta longitudes máximas de 25 o 30 mer, o sintetizándolos *in vitro*, mediante síntesis convencional basada en fosforamiditas, (26) de cadenas de hasta 120 mer, y posterior deposición.

I.2.2. LA SUPERFICIE.

Las superficies planas sobre las que se ubican estas matrices son de cristal de dióxido de silicio (SiO_2) tratadas para aumentar su dureza, con HF para alisarlas y con reactivos organosilanos (compuesto orgánico con un átomo de silicio), que reaccionan con el cristal formando ésteres de silicio a los que se podrán unir biomoléculas (ácidos nucleicos). Las principales superficies empleadas en la fabricación de biochips son las derivadas de aminas y de aldehído.

I.2.2.1. Superficies de aminas. Son derivados de (organo)silanos que contienen aminas (aminosilanos), con diferentes propiedades según la naturaleza del sustituyente amina y de los otros grupos orgánicos unidos al átomo central de silicio, confiriendo carga positiva a la superficie del biochip, permitiendo la unión inespecífica (adsorción) de las moléculas de ácidos nucleicos mediante interacciones electrostáticas.

I.2.2.2. Superficies aldehído. Son superficies con silanos unidos covalentemente al cristal que contienen grupos reactivos aldehído en el extremo de una cadena carbonada alifática de mayor tamaño que la de las superficies aminadas. En este caso la biomolécula se incorpora de forma específica al microarray mediante la formación una imina sustituida, o Base de Schiff por un enlace covalente con el grupo reactivo a través de una amina primaria añadida a su extremo 5'.

I.2.3. LA IMPRESIÓN.

En el caso de síntesis *in vitro* de la muestra, ésta deber ser posteriormente colocada o *impresa* sobre la superficie tratada. Este proceso es totalmente automático, y se realiza por maquinaria robótica. Hay dos grandes sistemas de impresión de microarrays: impresión por contacto e impresión sin contacto, según se establezca interacción o no entre la superficie del array y el dispositivo de impresión. Entre los primeros destacan la microimpresión con puntas de acero sólidas (*microspotting*), el empleo de puntas

capilares y el PAR (*Ping And Ring*). Entre los segundos, la inyección (como una impresora) y sistemas piezoeléctricos.

En los casos de síntesis *in situ*, se emplean técnicas de fotolitografía con luz ultravioleta y síntesis en fase sólida. El rendimiento y complejidad de estos sistemas solo permite la fabricación de cadenas cortas de nucleótidos, de unos 30 mer como máximo.

I.2.4. EL MARCAJE DE LAS SONDAS.

El marcaje de moléculas de aRNA o de cDNA es la unión de marcas o moléculas indicadoras. El que se usa más ampliamente es el fluorescente, empleando fluoróforos derivados de compuestos de cianina, sobre todo Cyanine 3 (Cy3), derivado de la indocarbocianina y Cyanine 5 (Cy5), derivado de la indodicarbocianina, por su mayor fotoestabilidad, menor hidrofobicidad y mejor separación espectral, con máximos de excitación de $\lambda_{ex} = 550 \text{ nm.}$ y $\lambda_{ex} = 649 \text{ nm.}$, y de emisión $\lambda_{em} = 570 \text{ nm.}$ y $\lambda_{em} = 670 \text{ nm.}$, respectivamente. Se pueden incorporar a nucleótidos modificados 5-(3-aminoalil)-UTP presentes en las muestras, con cuya cadena alifática alil reaccionan (figura 1.3), o formando parte de un nucleótido fluorescente de tipo FluoroLink Cy3-AP3-dUTP o Cy5-AP3-dUTP o similar (figura 1.4).

Existen dos tipos de marcaje:

I.2.4.1. Marcaje directo: Las marcas fluorescentes se unen mediante enlaces covalentes a las moléculas de ácidos nucleicos por procedimientos enzimáticos o químicos. El marcado del material puede ser simultáneo a la síntesis de este u ocurrir posteriormente. Entre los ejemplos más representativos se encuentran los procedimientos que implican retrotranscripción, en los que se obtiene cDNA marcado a partir de mRNA, y el procedimiento de Eberwine (187), en el que partiendo de mRNA se sintetiza DNA de doble cadena y se realiza una transcripción *in vitro* basada en el promotor de T7 que rinde una amplificación lineal de RNA (aRNA), y de la señal obtenida, de 10^6 veces.

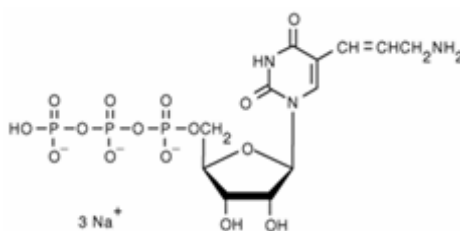


Figura 1.3. Estructura de un nucleótido aminoalil-UTP. El fluoróforo, Cy3 o Cy5, reacciona con el grupo alil sustuyente en la base nitrogenada del nucleótido, formando un enlace N-éster.

I.2.4.2. Marcaje indirecto: Unión no covalente de los fluoróforos al material de experimentación mediante una molécula puente (*molecular bridge*) que es la unida covalentemente al reactivo fluorescente. Los métodos más representativos de esta estrategia son los que emplean un complejo de tiramida-Cy3 (la peroxidasa conjugada a un anticuerpo que reconoce moléculas de biotina unidas a la sonda oxidada al complejo y éste se adhiere a la superficie del biochip) y dendrímeros (moléculas ramificadas con más de 300 moléculas fluorescente cada una) que se unen a secuencias de reconocimiento presentes en la muestra.

La realización de intercambio de fluoróforos (flip-dye) es otro punto de controversia en la experimentación con biochips, ya que se considera muy deseable para una corriente de autores (133, 202), mientras que para otros tiene un valor limitado como control (25) y en la mayoría de diseños experimentales parece innecesario (42) puesto que no afecta a la comparación (38).

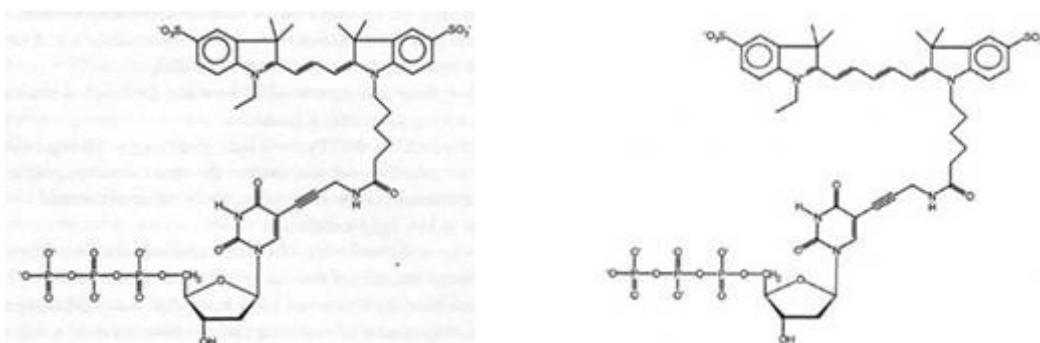


Figura 1.4. Nucleótidos fluorescentes. Izquierda Cy3-AP3-dUTP. Derecha Cy5-AP3-dUTP.

I.2.5. LA HIBRIDACIÓN.

La hibridación es una reacción no lineal de formación de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias de los ácidos nucleicos constituyendo usualmente estructuras dobles (*duplex*) ente dos moléculas de ácidos nucleicos. Se ve afectada por varios factores como el pH, temperatura y la concentración salina del medio en que ocurre, la longitud, secuencia primaria, estructura secundaria y grado de homología de las moléculas a hibridar, etc., y en el caso de esta técnica, por la hidrofobicidad de los componentes, la desecación y la humedad relativa. La hibridación entre las moléculas mezcladas en un microarray es *competitiva y comparativa*, y la cinética de este proceso permite la determinación de los niveles de expresión relativa basada en la relación con la que las sondas hibridan en un elemento individual de la matriz. Durante la hibridación también es necesario bloquear los grupos reactivos libres de la superficie del microarray para evitar uniones inespecíficas, para lo que se emplea SDS y BSA.

I.2.6. LAS IMÁGENES.

I.2.6.1. Adquisición de imágenes. Las imágenes de microarrays hibridados se adquieren empleando escáneres que deben ser capaces de emitir luz de tipo láser a la longitud de onda de excitación de cada uno de los fluoróforos empleados (*canales*), recoger la radiación emitida en forma de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de los mismos y transformarla en una señal cuantificable. Sin embargo, la excitación causa un daño al fluoróforo que desestabiliza la partícula y merma su capacidad de emisión. Este fenómeno se conoce como *photobleaching* o fotodecaimiento y afecta de forma desigual a ambos fluoróforos.

Otro efecto negativo en el empleo de técnicas basadas en fluorescencia es la *compresión de señal*: la señal es menor que la que correspondería a una proporcionalidad directa entre la fluorescencia emitida y la cantidad de fluoróforo presente en un *spot*. Así, un aumento de 10 veces en el número de moléculas fluorescentes hibridadas a la muestra impresa en un *spot* dado, conlleva un aumento en la señal de fluorescencia emitida por las mismas de tan solo 6,8 veces. Por tanto la asunción de la hibridación en microarray como una técnica de carácter cuantitativo debe supeditarse al empleo de controles con concentraciones conocidas para realizar una normalización adecuada.

La fluorescencia emitida es captada por tubos fotomultiplicadores (*PMT*), que poseen un fotocátodo recubierto con un metal alcalino que al recibir el impacto de un fotón emite un electrón que será capturado por otro cátodo de metal alcalino mantenido con carga positiva, que a su vez liberará más electrones. Este proceso de amplificación depende del número de fotones incidentes (intensidad de la luz) y del voltaje del tubo. La corriente eléctrica generada es medida por un electrodo final y posteriormente digitalizada. Sin embargo, la naturaleza estocástica de la producción de electrones a partir de un fotón (un fotón provoca la emisión de un número de electrones ajustable a una curva gaussiana) y la diferente eficiencia de la emisión de luz entre fluoróforos, son la causa de los problemas de desviación en los valores dependiente de intensidad que se encuentran al trabajar con la relación de las señales de ambos canales.

I.2.6.2. Análisis de imágenes y obtención de datos. Las imágenes adquiridas deben analizarse computacionalmente para atribuir a cada *píxel* los valores de intensidad recogidos de la superficie del biochip. El valor de la medida obtenida por los dispositivos, es la suma de la *señal*, o valor debido a la cantidad real de fluorescencia emitida, y el *error* o *ruido* asociado, es decir, valores que no se deben a datos experimentales sino a contribuciones no deseadas.

Para cada canal empleado, los valores correspondientes a las moléculas que emiten fluorescencia presentes en cada *spot* son asignados mediante plantillas de impresión donde se recoge la posición dentro del microarray y otros datos de la fabricación. Los

valores medidos en las zonas del biochip en las que no hay *spots*, se consideran el fondo de fluorescencia presente en el biochip.

I.2.7. LOS DATOS.

I.2.7.1. Estructura de los datos. En los microarrays donde se hibridan dos tipos de moléculas fluorescentes, los datos que se obtienen para cada punto poseen dos valores, uno por cada canal. El valor de señal representativo para cada *spot* se obtiene de la media o la mediana de los valores de intensidad de todos los píxeles que lo forman. Después de sustraer los valores del fondo para cada uno (empleando varios métodos: sustracción del fondo global, de las medias o medianas de las intensidades del fondo local que rodea a cada *spot*, de la señal mínima en todo microarray, etc.), la señales netas se relacionan para obtener un *cociente, relación o ratio* de ambos canales, correspondientes a las moléculas fluorescentes de cada sonda en cada *spot*. Estos datos se pueden representar para observar la distribución de la nube de puntos, con formas parecidas a una punta de flecha (*tadpole*) o ahusada ⁽¹⁶³⁾, en un gráfico RI (Ratio-Intensity, ⁽²⁰²⁾) o MA ⁽²⁰³⁾. En este tipo de gráficos (figura 1.5) se representa el logaritmo del cociente de canales frente a la mitad del logaritmo de la multiplicación de los mismos (equivalente a la media geométrica de las intensidades de ambos canales) para cada gen, como una medida de los niveles relativos de expresión.

En los gráficos RI-MA se pueden observar una serie de características que ponen de manifiesto desviaciones y problemas en el conjunto de los datos obtenidos que deben tenerse en cuenta para aplicar métodos de corrección, normalización, etc ⁽¹⁶³⁾.

La aplicación de cocientes y logaritmos transforma los valores numéricos de los datos sin alterarlos en esencia. Los dos valores por *spot/gen* obtenidos a partir de una imagen, con un rango de 0 a 65535 correspondiente a los 65536 valores de intensidad que puede tener un píxel en un sistema binario computacional de 16 *bytes* (2^{16}), se condensan en un cociente (*ratio*) que aporta información sobre la expresión relativa en ambas muestras. El rango de distribución de estos valores es asimétrico de forma que cocientes igual a 1 indican invariabilidad, superiores activación, e inferiores represión. Al tomar logaritmos (log-ratios), usualmente de base 2 o decimales, la distribución de los valores vuelve a cambiar haciéndose simétrica en torno a la neutralidad (cero), adoptando valores positivos para sobreexpresión y negativos para represión y disminuyendo el rango hasta valores más manejables (ej: +16, -16 en el caso de \log_2). Además, el ruido, que en una medición de microarrays es multiplicativo al ser función de la intensidad de la señal, pasa a ser aditivo ^(41, 133).

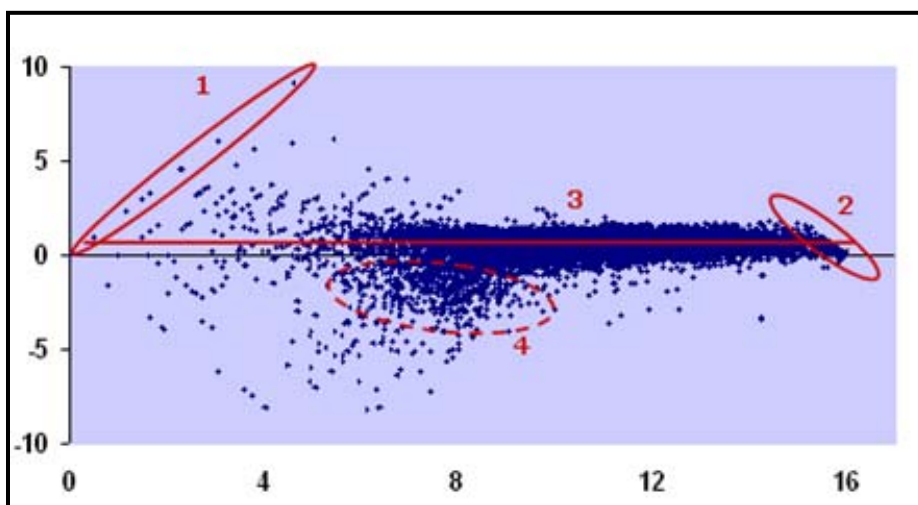


Figura 1.5. Gráfico RI-MA. La representación de los valores de intensidad y relación entre canales permite la identificación de ciertas características de la población de datos. 1. Cuantización: la existencia de valores menores al límite inferior se manifiesta como alineamientos de puntos en las zonas de muy baja intensidad debido a asignaciones de valores de forma discreta. 2. Saturación de canales en las zonas de alta intensidad que provoca un truncamiento de la forma. 3. Descentrado, la nube no se centra en cero (la relación en la expresión de la mayoría de genes debe ser 1 y su logaritmo 0) debido a desviaciones en los fluoróforos. 4. Asimetría en la forma a intensidades bajas debida a variaciones sistemáticas dependientes de intensidad en los log-ratios.

1.2.7.2. Análisis de datos. Debido a la gran cantidad de datos generados en los experimentos con microarrays son necesarios varios pasos de cálculo y tratamiento, que se conocen como pre-proceso o simplemente *proceso*. La estrategia a seguir busca alcanzar unas condiciones que favorezcan el procesamiento posterior y la comparación final de genes más que la eliminación del mayor número posible para simplificar el conjunto (8). De forma general se proponen modelos de análisis de datos consistentes en tres pasos: normalización de biochips individuales mediante lowess, seguido del filtrado de réplicas para eliminar elementos cuestionables, y finalmente una estimación de z-score local para la identificación de genes diferencialmente regulados.

Existen varios programas de análisis de datos, comerciales o libres disponibles en internet, con diferentes capacidades de trabajo. Algunos de estos son el TM4 (www.TM4.org), Bioconductor (www.bioconductor.org), BASE (base.mgh.harvard.edu/), BRB Tools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>), Genesifter (www.genesifter.net) Rosetta (www.rosettabio.com), AlmaZen (www.bioalma.com), etc... Los procedimientos más comunes llevan a cabo varias etapas (8, 25, 64, 107, 134, 158): Normalización, transformación, asignación de valores perdidos, reescalado y filtrado.

1. La normalización es el proceso computacional en el cual datos de diferentes orígenes (canales o biochips) son ecualizados para eliminar las desviaciones por errores sistemáticos, la variabilidad biológica inherente a los experimentos con microarrays y ajustarlos a una distribución normal sin alterar la información contenida. Existen varios métodos de normalización: (i) Intensidad total, útil en experimentos de expresión génica

diferencial donde control y caso tienen el mismo origen biológico. (ii) Genes de mantenimiento, apropiados en experimentos con diferentes orígenes, porque tienen un comportamiento similar y el resto de genes varían significativamente. (iii) Estándar interno: mRNA de especies ajenas añadido en cantidades conocidas durante el marcaje para realizar una curva estándar que permita interpolar valores de expresión génica. (iv) Regresión, basada en la suposición de que la mayoría de genes no tiene regulación diferencial al compararlos en un microarray. Existen dos tipos: regresión lineal o independiente, que aplica la misma normalización a todos los genes con independencia de la intensidad; y ajuste no lineal, adaptándose a los valores, y de la que existen dos subtipos: (a) Single Slide Normalization ⁽²⁰⁴⁾, basada en la suposición de que la forma de los RIMA debe ser simétrica en torno a $M (\log(R/G))$ en un experimento sin errores sistemáticos por dependencia de intensidad de señal y en el que la mayoría de los genes no presentan expresión diferencial, constatándose en gráficos reales el aumento sistemático de M o R según decrece I o A . Esto hace inadecuado al transformación global de datos, que reescalaría los valores dejándolos cualitativamente idénticos, por lo que es necesario un ajuste en los valores de log-ratio consistente en la sustracción de la *media local*, siendo el método estadístico *LOWESS* ⁽²⁷⁾ el más aceptado para el cálculo de dicha media local ^(40, 202, 204). (b) Paired-Slide Normalization, cuando se espera un número significativo de genes diferencialmente expresados, sin simetría en torno a M , y se hace necesario un intercambio de fluoróforos para la eliminación de errores. (v) Ratio Statistics: métodos computacionales intensivos donde se asume un coeficiente de variación constante ⁽³²⁾, o no constante ⁽⁷¹⁾.

2. La transformación logarítmica de datos, expuesta anteriormente.

3. La asignación de valores perdidos. Existen varias técnicas para sustituir valores perdidos por errores en cualquier punto del proceso experimental empleando diversos algoritmos. Los más usuales son el KNN y SVD ⁽¹⁸¹⁾.

4. El reescalado o estandarización de valores hace que éstos sean comparables dotándolos de valor medio 0 y desviación estándar 1.

5. El filtrado busca la eliminación de perfiles correspondientes a genes que no varían su expresión o cuyas variaciones no se pueden asegurar como verdaderas al no cumplir los requisitos de un umbral máximo de valores perdidos y un umbral mínimo de diferencia entre la desviación estándar del gen dado y el conjunto de todos ⁽⁴³⁾. Para establecer un umbral de diferencia entre la expresión de un gen con respecto al conjunto y considerarlo como efectivamente alterado, se pueden aceptar diferencias de desviación estándar de 2 veces y cambios en la expresión superiores a ± 2 veces de inducción o represión ⁽⁶⁴⁾. De esta forma la expresión diferencial es estadísticamente fiable.

Después del procesado, los datos son analizados empleando la metodología más acorde al tipo de análisis buscado. En el caso de expresión génica diferencial, los métodos de elección se basan en el cálculo del Z-score (Z-test, Z-ratio ⁽³¹⁾), que minimiza errores o artefactos ocurridos en el marcaje, hibridación y adquisición de imagen; PCA: Análisis de la componente principal, un método exploratorio de reducción dimensional de la complejidad de datos de microarrays ⁽³⁹⁾, y SAM: Análisis de Significación de Microarrays, que combina el cálculo de un valor estadístico de *t-test* con análisis de permutación y cálculo de un FDR, *False Discovery Rate*, ⁽¹⁸²⁾. Otros métodos de análisis construyen clases (clusters) para clasificar genes según el “parecido” en su expresión ^(43, 174). Existen diferentes métodos y algoritmos según se quieran clasificar experimentos o genes, y dicha clasificación sea supervisada (se conocen los casos y el control con los que se experimenta) o no supervisada (sin información previa, se desconocen cuantas clases de casos se tienen), y jerárquica o no jerárquica. Los más extendidos son Aglomerativo ⁽⁴³⁾, Self-Organizing Maps ⁽⁸²⁾, k-Mean Cluster ⁽⁶²⁾ y SOTA: Self-Organizing Tree Algorithm ⁽⁶⁷⁾.

I.2.8. LOS RESULTADOS.

Para que los resultados obtenidos puedan considerarse válidos, son necesarios al menos tres biochips ⁽⁹²⁾, o un número mayor, según las condiciones particulares de cada experimento, que puede determinarse como se propone en ^(19, 199).

Los resultados obtenidos del análisis de los datos de microarrays deben ser interpretados empleando bases de datos de carácter biológico, que integran y manejan los datos para extraer la mayor información posible (*Data Mining*) y darles una explicación fisiológicamente relevante. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, las bases de datos de SGD (www.yeastgenome.org) y Gene Ontology (www.geneontology.com) proveen una buena información específica en diversos campos.

La diversidad de los procedimientos empleados en la experimentación con microarrays y la complejidad de los datos hacen necesaria una estandarización del formato de los resultados generados. Dicha estandarización está propuesta por la MGED (*Microarray Gene Expression Data Society*, www.mged.org) con el empleo del formato de datos MIAME (*Minimal Information About Microarray Experiment*, Mínima información sobre el experimento de microarrays) ⁽²²⁾. Esta información se puede almacenar en bases de datos de acceso público como la de Stanford (*The Stanford Microarray Database*), la mayor sobre experimentos de *dos colores*, o ArrayExpress, donde está recogida la información procedente de miles de biochips y los experimentos y protocolos asociados.

I.2.9. APLICACIONES DE LA EXPERIMENTACIÓN CON BIOCHIPS.

Las aplicaciones de los microarrays a la investigación científica han sido diversas desde la publicación de los primeros trabajos (97, 159). *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el organismo eucariota con el que se ha realizado el mayor número de experimentos con microarrays, desde que se completó la secuenciación de su genoma (51). El primer experimento de microarrays con *Saccharomyces cerevisiae* se basó en el estudio de ciclo celular (174) y desde entonces el empleo de esta técnica ha estado creciendo de forma exponencial en la investigación de esta levadura y otros organismos. Restringiéndonos a *Saccharomyces cerevisiae*, han aparecido 81 publicaciones científicas con un total de 2394 hibridaciones en microarrays (68) (<http://imperio.princeton.edu:3000/yeast/>) que han permitido conocer los mecanismos de adaptación celular a distintos estímulos externos (choque térmico, fuente de carbono, otros nutrientes, presencia de inhibidores) o la respuesta celular en distintos mutantes de levadura. Además de analizar los mRNAs transcritos en la célula, en los últimos años, los microarrays han sido utilizados para el análisis del estado traduccional de los mensajeros en distintas condiciones fisiológicas, ilustrando la eficiencia de la traducción de cada uno, así como su posible regulación. Algunas publicaciones que emplean la tecnología de microarrays aplicada a este tipo de estudio se pueden encontrar en (7, 89, 164) .

II. Materiales y métodos.

*Experimenta despacio, que tengo prisa.
Napoleón Bonaparte, adaptación.*

II.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

II.1.1. CEPAS DE MICROORGANISMOS.

II.1.1.1. Bacterias.

La cepa de bacteria empleada se indica en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Cepa de *E.coli* empleada para la producción de plásmidos.

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5 α	SupE44, Δ lacU169, ϕ 80lacZ Δ M15, hsdR17(r $_{K}^{-}$ m $_{K}^{+}$), recA1, endA1, gyrA96, tji-1, relA1, F $^{-}$, deoR	Hanahan, 1983 (59)

II.1.1.2 Levaduras.

Las cepas de levadura empleadas en este trabajo se relacionan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Cepas de *S.cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
W303-1b	MAT α , leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ura3-1, ade2-1, can1-100.	Rothstein, RJ. 1983 (148)
WL25TT	W303-1b, RPL25:TAP:TRP1	Este trabajo.
SC142	MAT α , his3, can1.	Remacha y col. 1990 (140)
XU617	MAT α , leu2, trp1, ura3, his2.	Remacha y col. 1990 (140)
D4	MAT α , RPP2A::URA3, leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, ade2-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D5	MAT α , RPP2B::HIS3, leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D6	MAT α , RPP1B::TRP1, leu2-3,112, his3-11,15, ura3-1, ade2-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D7	MAT α , RPP1A::LEU2, trp1-1, his3-11,15, ura3-1, ade2-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D45	MAT α , RPP2A::URA3, RPP2B::HIS3, leu2-3,112, trp1-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D46	MAT α , RPP1B::TRP1, RPP2A::URA3, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D47	MAT α , RPP1A::LEU2, RPP2A::URA3, his3-11,15, trp1-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D56	MAT α , RPP1B::TRP1, RPP2B::HIS3, ura3-1, leu2-3,112, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D57	MAT α , RPP1A::LEU2, RPP2B::HIS3, ura3-1, trp1-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D67	MAT α , RPP1A::LEU2, RPP1B::TRP1, his3-11,15, ura3-1, can1-100.	Remacha y col. 1992 (141)
D456	MAT α , leu2-3,112, RPP1B::TRP1, RPP2A::URA3, RPP2B::HIS3, can1-100.	Remacha y col. 1995 (78)
D457	MAT α , RPP1A::LEU2, trp1-1, RPP2A::URA3, RPP2B::HIS3, can1-100.	Remacha y col. 1995 (78)
DL25TT	D457, RPL25:TAP:TRP1	Este trabajo.

D467	MAT α , RPP1A::LEU2, RPP1B::TRP1, RPP2A::URA3, his3-11,15, can1-100.	Remacha y col. 1995 (78)
D567	MAT α , RPP1A::LEU2, RPP1B::TRP1, ura3-1, RPP2B::HIS3, can1-100.	Remacha y col. 1995 (78)
D4567	MAT α , RPP1A::LEU2, RPP1B::TRP1, RPP2A::URA3, RPP2B::HIS3, can1-100.	Remacha y col. 1995 (78)
D4567KR	MAT α , RPP1A::KAN ^R :loxP, RPP1B::TRP1, RPP2A::URA3, RPP2B::HIS3, can1-100.	Cepa del laboratorio.

II.1.2 MEDIOS DE CULTIVO.

II.1.2.1 Medios de cultivo de *E. coli*.

LB (Luria-Bertani): Bactotripton 2%, NaCl 1% y extracto de levadura 1%. Se emplea en el cultivo rutinario de bacterias, añadiéndole ampicilina (100 μ g/ml) para la selección de cepas transformantes que expresen resistencia frente a este antibiótico, y agar a una concentración final del 2% para medio sólido.

II.1.2.2. Medios de cultivo de *S. cerevisiae*.

II.1.2.2.1. YEPD: Medio rico indefinido para el cultivo rutinario de levaduras. Se compone de bactopectona 2%, glucosa 2%, y extracto de levadura 1%.

II.1.2.2.2. SC: Medio mínimo de enriquecimiento compuesto por base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos 0,67%, glucosa 2%, y CSM drop-out -his -leu -trp -ura (BIO101) según las indicaciones del fabricante, que se emplea para selección, crecimiento y mantenimiento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, añadiendo los requerimientos prototróficos o los antibióticos necesarios en cada caso.

II.1.2.2.3. YEPGE: Es un medio indefinido selectivo con fuente de carbono no fermentable. Se compone de bactopectona 2%, extracto de levadura 1%, glicerol 3% y etanol 2%.

En los casos en los que se mantienen cepas en cultivo sólido en placas de Petri, se añade agar a una concentración final de 2%.

II.1.3. PLÁSMIDOS.

Los plásmidos empleados se relacionan en la tabla 2.3

Tabla 2.3. Plásmidos empleados en las transformaciones de levaduras.

Plásmido	Descripción	Referencia
pBS1479	4,43 Kb, TRP1, AmpR, CBP-ProtA.	EUROSCARF
pYX142-mtGFP	8,72 Kb, Leu, ARS/CEN.	Westermann, B ₍₁₉₅₎

II.1.4. OLIGONUCLEÓTIDOS.

Se diseñaron una serie de oligonucleótidos para los experimentos de RT PCR cuantitativa y purificación en tandem por afinidad (TAP) que se detallan en la tabla 2.4

Tabla 2.4. Oligonucleótidos. Diseñados con Oligos 6 y sintetizados por Invitrogen (75). En los empleados en los experimentos de RT PCR cuantitativa se muestran el nombre de las sondas, su secuencia y el gen para la que fueron diseñadas. En los empleados en la construcción de L25TAPTRP se indica en cursiva las regiones complementarias a la secuencia del epítipo TAP.

Oligo	Secuencia	Gen
5'Act rtPCR	ACGAATTGAGAGTTGCCCCAGAAGA	<i>ACT1/YFL039C</i>
3'Act rtPCR	TTGAAGAAGATTGAGCAGCGGTTTG	
AIF1up	AAGAAGGAACAGAGGCTAGTCTCGT	<i>AIF1/YNR074C</i>
AIF1low	GGAGAAAAGATTCTTCGACTTTGCT	
CTR3up	GCCAGAAGACGACCTGTAAAGA	<i>CTR3/YLR411W</i>
CTR3low	AAACGACCAACGATAGCACCTATTA	
MFAlfa2up	CCTTTCTCACTTTTATTTAGCGGC	<i>MF(ALPHA)2/YGL089C</i>
MFAlfa2low	CGCCGCAGCAATAGTGGTGTGATA	
MET2up	CTTCGGTAAGTTCTGTAACGGGTGA	<i>MET2/YNL277W</i>
MET2low	GTCTCTTGCCAAATCGTGCGTAT	
MET4up	AAACAATAATGGCGCGGACACT	<i>MET4/YNOL103W</i>
MET4low	TCCTCATGCAATACGTCGTGGTT	
MET13up	TTTATGTTGCCCAAGACTAAGTTGC	<i>MET13/YGL125W</i>
MET13low	TCCTTCCACGCTAAGAACGAAA	
NFS1up	GCATTATCCTCGGGTTCAGCCTGTA	<i>NFS1/YCL017C</i>
NFS1low	CATAATGGTGAAAGTCCCTCAAGA	
PHO4up	CGCCGCTAATACACACGCAAAG	<i>PHO4/YFR034C</i>
PHO4low	TTTCGGAGTTGGGATAACGCTGTC	
PHO5up	CCATACTACTCTTCCCTGGCGACT	<i>PHO5/YBR039C</i>
PHO5low	CCAGAATGACAATGAGCCGTTGAAT	
PHO11up	GAATGCTAAGAGACACGCTCGTGAT	<i>PHO11/YAR071W</i>
PHO11low	ATTGGTGGGCACTCAGAGTATTGG	
L25_5TA	TTAGATTGACTGCTGACTACGATGCTTTGGACATTGC TAACAGAATCGGTTACATTTCCATGGAAAAGAGAAG	<i>RPL25/TAPTRP</i>
L25_3TA	GTGCACTCTGCCACTACACTTTATTTACGCTTAATCAT GAATTTAACATGTTATGATACGACTCACTATAGGG	<i>TAPTRP/RPL25</i>
L25intron	GTGTTTCGTTTCGTTTTCTGCTC	Posición 263 del intrón de <i>RPL25</i>
L253'UTR	TTCCCGTTAAGCCAGTCGTA	Posición 500 del 3'UTR de <i>RPL25</i>

II.2. MÉTODOS.

II.2.1. MICROSCOPIA.

Se emplearon técnicas de microscopia óptica para la preparación y observación de muestras de cultivos de levadura empleando un microscopio óptico: Leitz DM RBE (Leica).

Se emplearon técnicas de microscopia de fluorescencia para preparar y obtener imágenes de cultivos de cepas transformadas con plásmidos y que presentan fluorescencia en el lumen mitocondrial. Para ello se emplearon los equipos Axioskop 2 (Zeiss) acoplado a Confocal MicroRadiance (BIO-RAD) del Servicio de Microscopia Óptica y Confocal.

II.2.2. TRANSFORMACIÓN CELULAR.

II.2.2.1. *Escherichia coli*.

Las bacterias competentes DH5 α se transformaron según el método del cloruro de rubidio y choque térmico descrito en (59). Los transformantes se seleccionaron empleando el marcador de resistencia a ampicilina portado en el vector.

II.2.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*.

Para transformar las células de levadura se empleó el método del acetato de litio modificado (49).

II.2.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

II.2.3.1. Obtención de DNA plasmídico de bacteria.

La preparación de DNA plasmídico de *E.coli* se llevó a cabo por el método descrito en (153) a partir de células cultivadas toda la noche en medio LB con ampicilina a 37°C y agitación a 250 rpm. en un baño Gyrotory Waterbath Shaker G76 (New Brunswick).

II.2.3.2. Obtención de RNA total de levadura.

Las células se cultivaron en YPD a 30°C y 210 rpm hasta valores de 0,5 o 0,6 de densidad óptica a 600 nm, se recogieron centrifugando 3' a 3000 rpm, se lavaron y se les extrajo el RNA total según el procedimiento indicado en RNeasy Kit (Qiagen). La cantidad de RNA se calculó a partir de los valores A_{260} obtenidos en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop). La calidad se analizó separando las muestras de RNA según su tamaño mediante electroforesis en gel de matriz porosa, en RNA Nano Chips, empleando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), aceptándose como buenos valores iguales o superiores a 2 en la relación 26S/18S.

II.2.3.3. Obtención de mRNA asociado a polirribosomas de levadura.

Las células se cultivaron en YPD a 30°C y 210 rpm hasta 0,5 ó 0,6 de D.O.₆₀₀ y se incubaron durante 3' con cicloheximida a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se recogieron centrifugando 3' a 3000 rpm. Se lavaron con buffer A (MgCl_2 10mM, KCl 80mM, TrisHCl 10mM pH 7,4, DTT 1 mM y cicloheximida 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ si es necesario) y se rompieron con perlas de vidrio en tubo Corex en 6 pulsos de 30s., dejando enfriar en hielo el mismo tiempo. Posteriormente se centrifugaron durante 30' a 13000 rpm y 4°C, y se cuantificó el RNA en el NanoDrop para cargar el equivalente a 1 ml de una solución a 20 U.A. a λ_{260} en un gradiente de sacarosa del 10% al 50% en buffer A. Se centrifugaron en un rotor TST41.14 o SW40Ti a 39000 rpm durante 2:30 horas a 4°C empleando una centrífuga Beckman L7-80M, se analizaron en un

fraccionador de gradientes ISCO recogiendo el material correspondiente a monosomas y polirribosomas, y se extrajo el RNA según (5,7). La cantidad obtenida se midió en el espectrofotómetro NanoDrop y la calidad se analizó en el Bioanalyzer.

Todas las soluciones empleadas fueron tratadas previamente con DEPC 0,05%. Todo el material empleado fue vidrio y se trató de forma adecuada para eliminar cualquier actividad RNAsa, sometiéndolo a calor seco con temperaturas de 140°C durante al menos 3 horas.

II.2.4. OBTENCIÓN DE DIFERENTES FRACCIONES CELULARES DE LEVADURA.

II.2.4.1. Obtención de la fracción S30.

Para obtener la fracción celular S30 de levaduras, se cultivaron en 50 ml del medio adecuado hasta los valores deseados de D.O.₆₀₀ y se recogieron centrifugando 3' a 3000 rpm. Se lavaron en solución 1 de levaduras (Tris-HCl pH 7,4 10 mM, KCl 80 mM, MgCl₂ 12,5 mM, β-mercaptoetanol 5 mM), se resuspendieron luego en 400 μl. de la misma solución con inhibidores de proteasa *Complete* (Roche), y se le añadieron 2 volúmenes de perlas de vidrio. Las células fueron lisadas con el rompedor automático de células FastPrep (BIO101) aplicando dos pulsos de 30" a fuerza 6, enfriando en hielo 2 minutos entre ambos. El extracto se centrifugó 15' a 4°C a 13000 rpm en una minicentrífuga Beckman Microfuge Lite. El sedimento se desechó y se volvió a centrifugar el sobrenadante en las mismas condiciones. La fracción sobrenadante resultante es la S30. La determinación de la cantidad de proteína se llevó a cabo según el método de Bradford (21) midiendo los valores de A₅₉₅ en un espectrofotómetro U-2000 (Hitachi).

II.2.4.2. Lavado salino de ribosomas (RSW).

El lavado salino de ribosomas realizado se basa en el procedimiento descrito en (96) con varias modificaciones en el cultivo y lisado celular, así como en la obtención de partículas ribosómicas 80S, a diferencia de lo propuesto en dicho trabajo, donde se obtienen las diferentes estructuras ribosómicas centrifugando a través de un gradiente continuo de sacarosa.

Se obtuvo un S30 según III.2.4.1, con varias modificaciones en los volúmenes de cultivo (1 litro de YPD) y en el proceso de lisado: en un mortero, añadiendo 2 g de arena de mar (Merck) y moliendo 2' por cada gramo de células. El homogeneizado fue recogido en 3 ml de solución de RSW (KAc 50mM, TrisHCl pH 7,5 20 mM, MgCl₂ 5mM, βME 1 mM) con inhibidores de proteasas *Complete* (Roche). Se continuó centrifugando de la forma indicada, y posteriormente a 90000 rpm durante 2 horas a 4°C en una Beckman TL-100 empleando un rotor TL-100.3 para sedimentar los ribosomas. Éstos se resuspendieron suavemente en 3 ml de solución RSW y se centrifugaron 16 horas en un colchón discontinuo de 7ml de sacarosa al 20% (4 ml) y 40% (3 ml) con las mismas condiciones iónicas, empleando la misma centrífuga y un rotor Ti70Ty a 45000 rpm. Estos ribosomas limpios en condiciones

iónicas de baja concentración de sales se resuspendieron en 400µl de solución RSW y se les añadieron los volúmenes necesarios de KAc 4M para alcanzar la concentración de lavado deseada (100 ó 500 mM KAc), mezclando con suavidad e incubando en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo los ribosomas se sedimentaron nuevamente, quedando en el sobrenadante las proteínas lavadas de los *cores* ribosómicos. Estas proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford ⁽²¹⁾, y se precipitaron con 3 volúmenes de TCA al 13,3% en acetona dejando a -20°C al menos 1:30 horas. Tras centrifugar 15 minutos a 4°C, el precipitado se lavó con acetona dos veces y se dejó secar a temperatura ambiente.

Los *cores* ribosómicos se resuspendieron en bicarbonato amónico 100mM. La cantidad de rRNA presente se estimó mediante valores de A_{260} .

II.2.4.3. Análisis de perfiles de polisomas en gradiente de sacarosa.

Las células se cultivaron en YPD a 30°C y 210 rpm hasta 0,5 ó 0,6 U.A. a A_{600} , se recogieron centrifugando 3' a 3000 rpm y se lavaron con buffer A (con o sin cicloheximida). Las levaduras se rompieron con perlas de vidrio empleando el FastPrep con las siguientes condiciones: fuerza: 6, tiempo: 30s, dos veces, enfriando en hielo durante 1' entre ambas. Posteriormente se centrifugaron 30' a 13000 rpm y 4°C y se cuantificó la A_{260} en el NanoDrop para cargar el equivalente a 1 ml de una solución a 5 U.A. en un gradiente de sacarosa del 10% al 30% ó del 10% al 50%. Después de centrifugarlos en un rotor TST41.14 o SW40Ti a 39000 rpm durante 3:45 horas a 4°C, los gradientes se leyeron y se fraccionaron en su caso, empleando un equipo Absorbance/Fluorescence Monitor UA-5 y Density Gradient Fractionator 185 (Teledyne Isco) conectado a un PC con el programa informático *PicoLog for Windows*. La comparación de los picos correspondientes a las estructuras ribosómicas que se observan en estos perfiles de polisomas en gradientes de sacarosa se realizó analizando las imágenes con el programa *Image J* para obtener las áreas bajo los picos. Los datos se trataron con una hoja de cálculo.

II.2.4.4 Purificación de ribosomas por cromatografía de afinidad.

La purificación de ribosomas mediante columna de afinidad se realizó siguiendo el método descrito en ⁽¹⁴²⁾. En nuestro caso, el epítipo TAP, base de la técnica, se fusionó a la proteína ribosómica L25, por ser esencial, presentar una única copia en el ribosoma, y ensamblarse en las primeras etapas de la biosíntesis de la subunidad 60S. La proteína de fusión expresada se compone de la proteína ribosómica L25, un módulo de calmodulina, y un fragmento de la proteína A. Brevemente: las cepas de levadura que expresan la construcción RPL25:TAP integrada en su genoma, son lisadas manualmente empleando perlas de vidrio como se describe en apartados anteriores, en presencia de soluciones con una concentración iónica baja que no pueda provocar la disociación de proteínas asociadas al ribosoma. Este extracto se purifica en un primer paso empleando una columna de

afinidad de IgG (inmunoglobulina G), a la que se unirá el módulo de proteína A del epítipo TAP fusionado a la proteína L25 incluida en las subunidades 60S maduras de todos los ribosomas de la célula. La elución de la fracción purificada se realiza por métodos enzimáticos mediante el corte con la enzima TEV, quedando unido a la inmunoglobulina de la columna únicamente el fragmento de proteína A. Esta fracción eluida se purifica en un segundo paso empleando una columna de afinidad a calmodulina, presente aún en la proteína de fusión con L25. La elución, y purificación final, se lleva a cabo por medios químicos, siempre a baja concentración sales. Los ribosomas obtenidos con esta técnica son más puros y mantienen más factores y proteínas asociadas en comparación a otras técnicas de purificación.

II.2.5 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.

II.2.5.1. Electroforesis de ácidos nucleicos.

Las electroforesis de DNA se llevaron a cabo en geles de agarosa/TAE a porcentajes desde el 0,8% al 1,5% siguiendo el procedimiento descrito en ⁽¹⁵³⁾ empleando equipos Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System (BIO-RAD).

II.2.5.2. SDS-PAGE.

Para los experimentos de SDS-PAGE se prepararon geles separadores a diferentes porcentajes de poliacrilamida, siguiendo el método descrito en ⁽¹⁵³⁾, y empleando un equipo Mini Protean 3 (BIO-RAD). Se aplicó corriente eléctrica a una intensidad de 20 mA por cada gel. Se usaron los marcadores de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standard Broad Range (BIO-RAD) y Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen).

II.2.5.3. Electroforesis bidimensional.

II.2.5.3.1. Isoelectroenfoque. (Primera dimensión).

El isoelectroenfoque se emplea para separar las proteínas existentes en una muestra según su punto isoelectrónico. Para ello, se hidrataron las tiras de pH inmovilizado con rango no lineal de 3 a 10 (Immobiline DryStrip, Amersham Bioscience) con solución de rehidratación (Urea 7M, tiourea 2M, Tris 40 mM pH 8,8, anfolitos de rango de pH adecuado al 1%, DTT 50 mM) durante 15 horas. Las muestras se desecaron, se resuspendieron en la misma solución y se cargaron en las tiras empleando cubetas de carga de muestra (*sample cups*). Se utilizó un equipo Ettan IPGphor II (Amersham Bioscience) que se programó en 5 etapas: un paso de 300V durante 4 horas, un gradiente de 1000V 5 horas, otro gradiente de 8000V 3 horas, un paso de 8000V hasta un total de 24000 Vh y el último paso de 500V 12 horas. Cuando concluyó el isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron durante 15' con 10 ml de DTT 65 mM en buffer de equilibrado (Urea 6M, SDS 2%, Tris HCl 50mM pH 8,8, glicerol 30%) y seguidamente otros 15' con 10 ml de IAA 135 mM en el mismo buffer.

II.2.5.3.2. SDS-PAGE. (Segunda dimensión).

Con la electroforesis SDS-PAGE se consiguen separar nuevamente las proteínas de una muestra, esta vez según su masa, en la segunda dimensión de los experimentos de geles bidimensionales. Para esto se prepararon geles de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida, Tris-HCl pH 8,8 375 mM, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,005%, empleando un equipo SE 600 Ruby (Amersham Bioscience). Las tiras de pH inmovilizado con las muestras se recortaron por los extremos reduciéndolas de 18 a 16 cm. y se cargaron en el gel SDS-PAGE al 10% de 16x16 cm. La carrera se desarrolló durante 14 horas a 10 mA/gel. Al finalizar se trató con solución de fijación (Metanol 50%, ácido acético 10%) durante 1 hora, y se tiñeron con Sypro Ruby durante al menos 4 horas a temperatura ambiente, o más tiempo a 4°C. Luego se lavaron dos veces con solución de lavado (Metanol 10%, ácido acético 7%) y la imagen se adquirió en un escáner Typhoon 9140 (Amersham Bioscience).

II.2.6. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA.

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana Immobilon-P (Millipore), de PVDF y tamaño de poro de 0,45 μ m, activada previamente con metanol durante 5' y equilibrada en la solución de transferencia (Tris HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM) durante otros 15'. La transferencia se llevó a cabo empleando el sistema húmedo de BIO-RAD aplicando una intensidad de corriente eléctrica de 20 mA por cada gel durante 1 hora en solución fría de transferencia (Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Al concluir, la membrana se incubó durante 15' con solución de bloqueo (TBS, leche desnatada en polvo 5%) y seguidamente con el anticuerpo primario diluido en la solución anterior, agitando durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C (Los anticuerpos empleados se relacionan en la tabla 2.5). Tras esto, la membrana se lavó tres veces con solución de bloqueo secundaria (TBS, leche desnatada en polvo 5% y Tween 20 0,1%.) agitando 3' y se incubó 30' a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con enzima peroxidasa, diluido en la misma solución. La membrana se lavó 3 veces durante 3' con TBS y Tween 20 al 0,1%, seguidamente con TBS en las mismas condiciones, y por último otro lavado con agua destilada. La reacción de quimioluminiscencia se desarrolló incubando la membrana en oscuridad durante 1' con luminol (3-aminoftalhidrazida) 1,25 mM, ácido cumárico 225 nM y agua oxigenada 0,0001% en Tris-HCl pH 8,8 100mM. La membrana se secó e inmediatamente se realizó la detección en películas Curix RP2 plus (Agfa) y el revelado en un procesador automático de revelado Kodak X-Omat Processor.

Las películas reveladas se analizaron en un escáner GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (BIO-RAD) para obtener datos a partir de las imágenes de los geles mediante densitometría empleando el programa Quantity One Versión 4.3.1 (BIO-RAD), y cuantificar las diferencias existentes entre las bandas.

Tabla 2.5. Relación de anticuerpos primarios y secundarios empleados en ensayos de Western-blot.

Anticuerpo	Dilucion empleada	Diana	Origen	Referencia
3BH5	1:10	Extremo carboxilo de las proteínas ácidas y P0	Ratón	Vilella y col. 1991. (191)
α HSP60	1:4000	Hsp60p	Ratón	Stressgen
α NFS1	1:1000	Nfs1p	Conejo	Lill, R. (80)
α ACO1	1:10000	Aco1p	Conejo	Pines, O. (136)
α EF1A	1:1000	Tef1p	Conejo	Gross, S. (56)
α EF2.83	1:2500	Tef2p	Ratón	Marcos, AG. No publicado
α EF3	1:10000	Yef3p	Conejo	Gross, S. (3)
α L25	1:2500	Rpl25p	Conejo	M.A. Rodriguez, No publ.
D α R/PO	1:2500	IgG de conejo	Burro	G.E. Healthcare
R α M/PO	1:2500	IgG de ratón	Conejo	Nordic Immunological Labs

II.2.7. HIBRIDACIÓN EN MICROARRAYS.

II.2.7.1. Oligoarrays.

Los biochips empleados son los Yeast GeneList V1.1.2, con oligonucleótidos de 70 mer y una media de temperaturas de hibridación de 73°C, fabricados por el servicio de genómica de la Universidad Complutense de Madrid, empleando los 6388 ORFs de la colección de oligos de la librería Array-Ready Oligo Set for the Yeast Genome V1.1. de Operon, impresos con un robot Microgrids II de Biorobotics, sobre cristales UltraGAPS de Corning con una capa de imprimación a base de aminosilanos y fijados con luz U.V.

Para la síntesis de la muestra se amplificó 1 μ g de RNA, total o asociado a polirribosomas, de cada una de las cepas, hasta aRNA según el protocolo propuesto en MessageAmp II aRNA Kit de Ambion, basado en el procedimiento de amplificación de Eberwine (187). La única modificación se realizó durante el paso de traducción *in vitro*: la disminución a la mitad de la concentración indicada de UTP, hasta 3,75 mM, para favorecer la incorporación de los nucleótidos modificados 5-(3-aminoalil)-UTP, añadidos a 3,75 mM, con cuyo grupo químico alil reaccionarían posteriormente los fluoróforos. Se optó por purificar la muestra de aRNA en un volumen final de 18 μ l, a los que se añadieron 2 μ l de Na₂CO₃ 1M a pH 9. Posteriormente se realizó un marcaje directo mediante una reacción de

esterificación entre el sustituyente alil de la base nitrogenada presente en el RNA amplificado y el extremo amino del fluoróforo, llevada a cabo añadiendo 3 μ l de fluoróforos Cy3 mono NHS éster ó Cy5 mono NHS éster (Amersham Bioscience) disueltos en DMSO. La reacción se incubó una hora a temperatura ambiente en oscuridad y se interrumpió acidificando con 1,5 μ l de AcNa 3M a pH 5,2 y neutralizando con agua tratada con DEPC hasta 25 μ l. Seguidamente se purificó con columnas AutoSeq G50 (Amersham Bioscience), apartando alícuotas de 1 μ l para comprobar la integridad de la muestra en el Bioanalyzer y otra de 1,5 μ l para medir en el NanoDrop empleando el módulo específico para microarrays. Con este módulo se realizaron medidas a diferentes longitudes de onda (A_{260} , A_{550} , A_{650}), a fin de calcular la cantidad de muestra (aRNA, con A_{260}) y de cada uno de los fluoróforos (Cy5 con A_{550} y Cy3 con A_{650}). Las muestras provenientes de cada cepa, marcadas con uno u otro fluoróforo y mantenidas por separado hasta este punto, se mezclaron aportando cantidades equivalentes de FOI de cada una de ellas (en torno a unos 100 pmoles de cada CyDye incorporado por μ g de aRNA). A esta mezcla se añadieron 10 μ g de esperma de salmón, 10 μ g de poli-A y fue desecada al vacío. Luego se resuspendió en 45 μ l de buffer de hibridación (Formamida 50%, SSC 6X, SDS 0,5%, reactivo de Denhardt 5X), se desnaturalizó incubando a 95°C durante 5', se dejó enfriar 15', y se extendió sobre un cubreobjetos abarcando la mayor área posible. Inmediatamente se colocó sobre éste la superficie del biochip, prehibridado y lavado (el biochip se prehibridó a 45°C durante 1 hora con una solución SSC 6X, SDS 0,5%, BSA 1%, se lavó tres veces con agua mQ, se sumergió 1 minuto en agua mQ hirviendo y se secó centrifugando 30 segundos a 1000 rpm), en la que están impresos los oligos y se hibridó a 43°C y 100% humedad en una cámara de hibridación (ArrayIt Hybridization Cassette; TeleChem InetRNAional, Inc.) durante 16 horas.

Al concluir la hibridación el microarray se lavó con agitación durante 10 minutos empleando las soluciones de lavado 1 (SSC 0,1X, SDS 0,1%) y 2 (SSC 0,1X), atemperadas previamente a 45°C, y finalmente con agua mQ, protegiéndolo de la luz en todo momento. Se secó inmediatamente en las condiciones anteriormente descritas, se eliminó cualquier partícula de su superficie usando un chorro de aire a alta presión y se adquirieron las imágenes empleando un G2565BA Microarray Scanner System (Agilent).

II.2.7.2. Microarrays de cDNA.

Se emplearon biochips de cDNA Y6,4K fabricados por el Microarray Centre. Clinical Genomics Centre. University Health Network. Canadá. Contienen los 6240 ORFs de la colección Y6,4K4 Gene List impresos sobre cristales UltraGAPS.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 30 μ g de RNA total en 14 μ l de agua. Se añadió 1 μ g de oligo-dT, se incubó 10' a 65°C y 2' en hielo. A partir de este punto todas las manipulaciones se hicieron protegiendo de la luz a las muestras. Se añadieron 3 μ l de cada

una de las soluciones 1 mM de FluoroLink Cy3-AP3-dUTP y Cy5-AP3-dUTP (Amersham Bioscience) en DMSO, 3 μ l de DTT 0,1 M, 2 μ l de enzima Superscript II (Invitrogen), 6 μ l de 5x 1st strand buffer, 1 μ l de Rnasa OUT, 0,6 μ l de mezcla de dNTP (25 mM dATP, 25 mM dGTP, 25 mM dCTP, 10 mM dTTP) y se incubó 10' a temperatura ambiente. A continuación se procedió a la síntesis de cDNA y el marcaje directo simultáneo del mismo, manteniendo la temperatura a 42°C durante 2 horas. La reacción se detuvo añadiendo 1,5 μ l de NaOH 1 M e incubando 15' a 65°C, se neutralizó con 1,5 μ l de HCl 1 M y se completó con agua libre de RNAsas hasta 50 μ l para purificar con Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Seguidamente se tomaron alícuotas para comprobar la calidad y la cantidad tanto del cDNA sintetizado como de la incorporación de los nucleótidos marcados, y se continuó el experimento como se describe en el apartado de hibridación de oligoarrays, a partir de la mezcla de cantidades equivalentes de FOI de cada una de las muestras.

II.2.7.3. Obtención y análisis de imágenes.

Las imágenes de los microarrays de cDNA y oligoarrays (aRNA) se obtuvieron con una resolución de 10 μ m/pixel en un área mínima de 21,6 mm x 61,2 mm del biochip, empleando el escáner de Agilent. Las imágenes proceden de una lectura simultánea de la fluorescencia emitida por los fluoróforos Cy3 y Cy5, con máximos de emisión λ_{em} = 570 nm y λ_{em} = 670 nm respectivamente, tras la excitación causada al primero por un láser SHG-YAG (532 nm) y al segundo por un láser de helio-neón (633 nm).

El análisis de las imágenes obtenidas se llevó a cabo empleando el programa Feature Extraction Software v7.1 (Agilent Technologies). La localización de los puntos con oligos impresos en el microarray (*spots*) se realizó con la plantilla de impresión suministrada por el fabricante del biochip. Para el análisis de los *spots* se seleccionaron: el método de CookieCutter y el rechazo de píxel desviado basado en IQR (Rango intercuartílico) del módulo SpotAnalyzer; la sustracción de fondo local del módulo BGSub; y la estimación de errores más conservativa entre el Modelo Universal de Error y el Error Propagado Basado en Intensidad de Píxeles, del módulo Ratio.

II.2.7.4. Análisis de datos.

Los datos de los biochips de oligonucleótidos y cDNA se analizaron con un programa desarrollado en lenguaje de programación R por la Unidad de Bioinformática del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". En primer lugar se realizó, para cada microarray, una corrección del fondo llevando a cabo un ajuste dinámico consistente en la sustracción a la señal, que en nuestro caso son las medianas de los valores de intensidad de los píxeles de cada *spot*, de únicamente un porcentaje variable del valor del fondo. Con esto se evita generar valores negativos de intensidad de señal.

Posteriormente, estos valores se relacionaron en un cociente para referenciar el mutante respecto al control (valores mutante/valores control) para cada *spot/gen*, y se les aplicó una transformación logarítmica encaminada a la reducción de la escala de valores con los que trabajar, y a hacer que el rango de éstos sea simétrico en torno a cero. En este punto se aplicó un ajuste por LOWESS⁽²⁷⁾ para corregir la posible desviación de los valores de *log ratio* a diferentes valores de intensidad, suavizarlos y centrarlos en cero.

La última fase consistió en la unificación de los datos de todos los microarrays, en la que se sometieron a una normalización y selección por Z-score, estableciendo un umbral de valores iguales o superiores a 3 en este parámetro para discriminar si las diferencias de los valores con respecto a la media (expresión génica no diferencial) son estadísticamente significativos.

II.2.7.5. Microarrays de Affymetrix.

Las hibridaciones se hicieron sobre dispositivos Affymetrix GeneChip: biochips de oligonucleótidos de 25-mer de la colección Yeast Genome S98 Array de Affymetrix sintetizados sobre una superficie de poliimida.

Se obtuvieron muestras de RNA total y asociado a polirribosomas (apartado II.6.1), y se enviaron al Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, donde fueron procesados e hibridados en biochips de Affymetrix. Los datos resultantes se analizaron en la Unidad de Bioinformática del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" empleando el programa RMA desarrollado por Irizarry ⁽⁷⁶⁾.

II.2.8. QRT-PCR.

Para realizar los experimentos de RT-PCR cuantitativa se partió de 1 µg de RNA total y se siguió el protocolo propuesto en Ligthcycler RNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), con las concentraciones indicadas de reactivos y oligonucleótidos (ver tabla 2.4), empleando un termociclador LightCycler (Roche Diagnostics). El ensayo constaba de las siguientes cinco fases: una incubación de 21' a 61°C para realizar la transcripción inversa; seguida del módulo de desnaturalización inicial a 95°C durante 30s.; tercera fase de 45 ciclos del módulo de PCR: 5s. a 95°C, 20s. a 55°C y 10s. a 72°C, programados con el modo de adquisición única de señal para análisis de cuantificación; luego un módulo de disociación (*melting*) para aumentar la temperatura de 45°C hasta 95°C con la menor pendiente posible, programado con el modo de adquisición continua para análisis de curva de hibridación, donde se comprueba la formación de estructuras secundarias entre oligos; y la última fase de enfriamiento hasta 37°C.

El contenido de los capilares en los que se desarrolla la amplificación se recogió y se corrió en un gel de agarosa al 1,5% para comprobar que sólo presentaban un único producto final con el tamaño adecuado en cada caso, variando en torno a 200 o 250 pb.

Para la programación del termociclador, obtención, visualización y manejo de los datos se empleó el programa informático *LightCycler Software*. El cálculo de expresiones se realizó según el modelo matemático propuesto por (120):

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}};$$

donde:

Ratio = diferencias de expresión entre cepas,

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\Delta\text{Cq}^* = \Delta\text{Cq}_{\text{gen}} - \Delta\text{Cq}_{\text{gen de normalización}},$$

normalizando con los mejores genes según el análisis hecho con el programa informático *geNorm* (188). *La sustitución de Cp por Cq se realizó según la nomenclatura propuesta por RDML (*Real-time PCR Data Markup Language*) (135).

II.3. SOPORTE INFORMÁTICO.

II.3.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.

II.3.1.1. Obtención y análisis de datos.

PicoLog for Windows, versión 5.13.4 (Pico Technology, Ltd.), para la captura de datos procedentes del fraccionador de gradientes.

AlmaZen System (Bioalma), para el análisis de datos y resultados de microarrays.

II.3.1.2. Bioinformática.

Oligo. Versión 6.65 (Molecular Biology Insight, Inc.), empleado en el diseño de oligos para los ensayos de RT-PCR cuantitativa.

LightCycler Software. Versión 3.5 (Roche Diagnostics), para obtener y analizar los datos procedentes del LightCycler.

geNorm software. Versión 3.5 (Ghent University Hospital Center for Medical Genetics), para analizar datos de QRT-PCR y establecer los mejores genes para normalizar.

II.3.1.3. Tratamiento de imágenes.

Feature Extraction Software v7.1 (Agilent Technologies), para analizar las imágenes procedentes de los microarrays y obtener datos numéricos.

Image J versión 1.36b (Wayne Rasband, NIH, USA). Se emplea para analizar los perfiles de polisomas y asignar valores a los picos dependiendo del área que delimitan.

Quantity One. Versión 4.3.1 (BIO-RAD). Se usa para tomar imágenes de películas reveladas de Western-blots y cuantificar las bandas por densitometría.

Photoshop versión 7 (Adobe Systems Inc.), para el manejo de imágenes de diverso tipo.

II.3.2. HERRAMIENTAS EN INTERNET.

Microarray Software Suite TM4: <http://www.tm4.org>, herramientas y conceptos varios sobre microarrays.

MultAlin: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>, para hacer alineamientos de secuencias.

mFold: <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/zukerm/home.html>, para calcular posibles estructuras secundarias en secuencias de MRNA.

geNorm: <http://medgen.ugent.be/genorm/>



III. Objetivos.

1. Identificación de mRNAs cuya traducción responda a alteraciones en la estructura del tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el empleo de la tecnología de microarrays. Para ello se desarrollarán tres etapas principales:

A. Estudio del transcriptoma para determinar qué genes se transcriben diferencialmente en mutantes del tallo ribosómico.

B. Estudio del traductoma para determinar qué genes se traducen diferencialmente.

C. Estudio comparativo de estos dos conjuntos de genes para determinar cuales muestran un comportamiento en traducción diferente al que muestran en transcripción, que podría estar mediado por un mecanismo de regulación sobre los mensajero que llegan a traducirse.

2. Identificación de motivos comunes a los mensajeros regulados.

3. Identificación de proteínas asociadas a ribosoma de forma diferencial.

IV. Resultados.

*No mandé mis muestras a luchar contra los elementos.
Felipe II, adaptación.*

IV.1. REGULACIÓN DIFERENCIAL EN MUTANTES EN EL TALLO RIBOSÓMICO.

La cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1b expresa todas las proteínas ácidas y sin embargo se ha comprobado la existencia de una población de ribosomas donde el tallo presenta proteínas ácidas y otra donde carece de ellas, constituido exclusivamente por la proteína P0⁽⁵⁸⁾. Los ribosomas con esta característica deben comportarse de forma diferente en la traducción, sirviendo quizás para la selección de determinados tipos de RNA mensajero de forma preferente al resto de ribosomas con tallos con la dotación completa de proteínas.

La expresión génica diferencial en el mutante D4567, que no tiene proteínas ácidas presentes en el tallo, con respecto a la cepa silvestre W303, está demostrada por la presencia de patrones diferentes en las proteínas separadas en geles bidimensionales de ambas cepas⁽¹³⁷⁾ y en extractos *in vitro*. Este hecho llevó a considerar la posible existencia de mecanismos de regulación de la expresión génica que actúen en la traducción. Se propuso un mecanismo de enriquecimiento diferencial de determinados mensajeros que serían traducidos de manera preferente por ribosomas sin proteínas ácidas. Según este modelo, la cantidad relativa de una determinada molécula de mRNA transcrita con respecto a la población total de transcritos de la célula, es diferente a la cantidad relativa de dicha molécula de mRNA que se traduce en comparación con la población total de mensajeros en traducción.

Para intentar demostrar esta hipótesis, se han realizado hibridaciones en microarrays comparando el mRNA total (transcriptoma) de ambas cepas, así como el RNA mensajero asociado a ribosomas que formen parte de estructuras polisómicas, sujetos por tanto a procesos activos de traducción (traductoma), de las mismas cepas (ver figura 4.1). Los valores de diferencias en la expresión génica entre cepas obtenidos en ambos tipos de experimentos se relacionaron entre sí buscando indicios de un enriquecimiento diferencial en los niveles de traducción en el mutante o en la cepa silvestre. Los genes que no muestren idéntica expresión génica diferencial (en el mutante con respecto al control) en transcriptoma y traductoma serán los que tengan regulación diferencial en la traducción.

Se han empleado diferentes sistemas de tratamiento de muestras, métodos de hibridación, y plataformas de biochips para buscar estas diferencias de expresión génica entre ambas cepas.

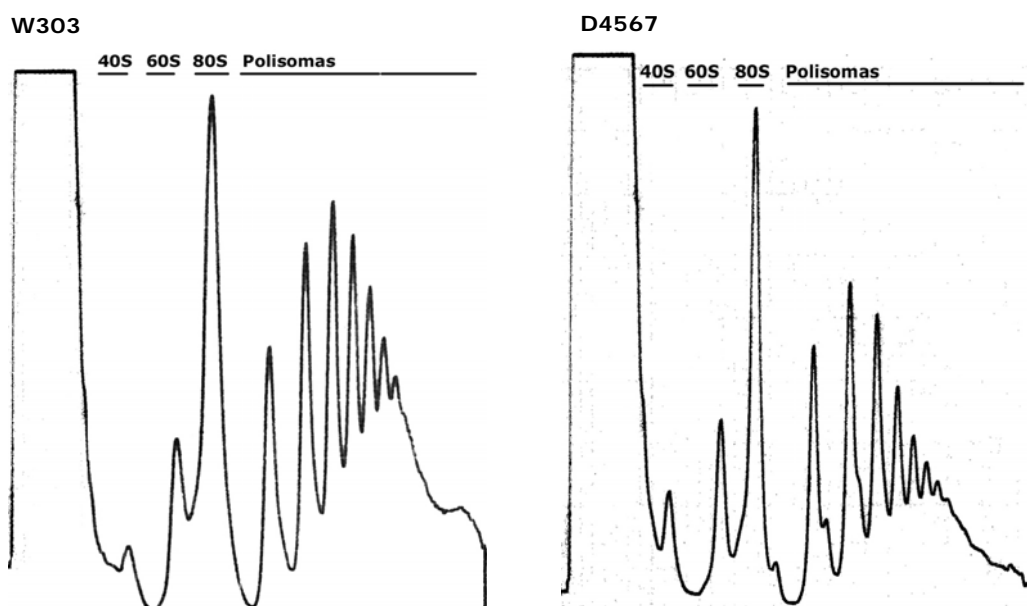


Figura 4.1. Perfiles de polisomas en gradientes continuos de sacarosa. Se recogen los picos de 80S y polisomas de cada cepa para extraer el mRNA asociado a éstas estructuras.

IV.1.1. Hibridación en oligoarrays Yeast GeneList V1.1.2.

Se emplearon 33 microarrays de oligonucleótidos de 70 mer fabricados en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid en los que cada gen estaba representado por dos réplicas, de los cuales se destinaron 17 a comparar la totalidad del RNA mensajero transcrito en la levadura silvestre W303 y en la mutante, y 16 para comparar el RNA mensajero asociado a polirribosomas de las dos cepas.

Se realizaron los marcajes directos y posteriores hibridaciones en biochips de los RNA amplificados empleando Cy5 con D4567 y Cy3 con W303, excepto para un conjunto de hibridaciones en las que se invirtió esta relación para realizar los correspondientes ensayos de cambio de fluoróforos. Este proceso se llevó a cabo de igual manera con las muestras de RNA mensajero total y RNA mensajero asociado a polisomas.

IV.1.1.1. Análisis de imágenes de oligoarrays.

Las imágenes de los oligoarrays se analizaron en el scanner de Agilent y los datos crudos resultantes se sometieron a un procesamiento a fin de evaluar su idoneidad para los análisis posteriores.

Parte de este proceso de los datos se basa en la representación de gráficas RI-MA, para lo cual se sustraen a cada *spot* los valores de fondo a los de la señal. Esta señal neta se opera matemáticamente para obtener la relación existente entre las señales emitidas por cada fluoróforo y la intensidad total de la misma que presenta cada *spot*. En la figura 4.2 se muestran dos representaciones generales de estos gráficos donde se puede observar la morfología en punta de flecha característica a la que deben aproximarse los valores obtenidos en un microarray, al representar la intensidad total de

la señal en ambos canales frente a la relación entre éstos.

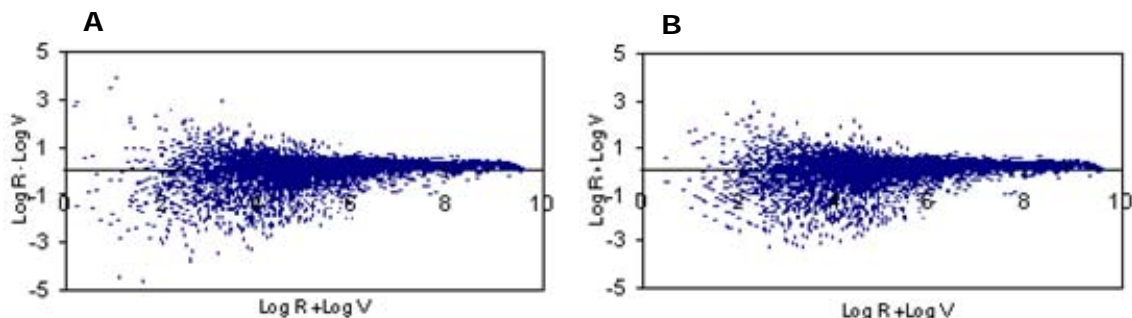


Figura 4.2. RI-MA plots. Se representa la intensidad de la fluorescencia ($\text{Log}(R) + \text{Log}(V) = \text{Log}(RV)$), y la relación entre fluoróforos ($\text{Log}(R) - \text{Log}(V) = \text{Log}(R/V)$). (A) Cálculos realizados con las medias de los valores de intensidad de cada *spot*. (B) Cálculos realizados con las medianas de dichos valores.

IV.1.1.2. Obtención de datos de oligoarrays.

Los resultados generados en la Unidad de Bioinformática del CBMSO se presentan en dos formatos: el primero gráfico y el segundo un listado de genes que muestran diferencias de expresión entre las dos cepas. En las gráficas se relacionan expresiones logarítmicas de la intensidad y del cociente de la señal en ambos canales, mostrando la significación estadística de los datos mediante z-score (31), aceptándose como válidos los iguales o superiores a 3. Las figuras 4.2 y 4.3 muestran una representación característica obtenida a partir de muestras de RNA total (figura 4.3) y asociado a polisomas (figura 4.4). En ambos gráficos están recogidos los genes cuyos datos procedían de 8 arrays de transcriptoma y 8 de traductoma que eran adecuados, según los RI-MA, para realizar todos los cálculos y obtener resultados estadísticamente significativos. Cada gen está representado por un punto cuyos valores comprenden los datos recogidos en todos los microarrays. Se han descartado aquellos genes que carecen de los datos de ambas réplicas para al menos un experimento. De los 6388 genes de levadura representados en los biochips, se obtuvieron resultados válidos para 6235 (97,62%) en los experimentos de transcriptoma y 6363 (99,6%) en los de traductoma. Se encontraron 107 genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas entre silvestre y mutante con un valor de $z \geq 3$ en el transcriptoma (31 activados y 76 reprimidos) y 142 en traductoma (36 activados y 106 reprimidos). Los genes con valores de z-score por debajo del umbral pero en zona de incertidumbre ($3 \geq z \geq 2$) se consideran en el límite de confianza, siendo 85 en transcriptoma y 309 en traductoma. El resto de genes tienen valores de diferencias de expresión entre W303 y D4567 que no pueden considerarse diferentes a los de la mayoría de la población (niveles de expresión iguales en las dos cepas) bajo criterios estadísticos. El listado completo de los genes con diferencias de expresión ($z \geq 2$) entre mutante y silvestre en la transcripción se recoge en el apéndice A.1 y los que muestran diferencias en traducción en el apéndice A.2.

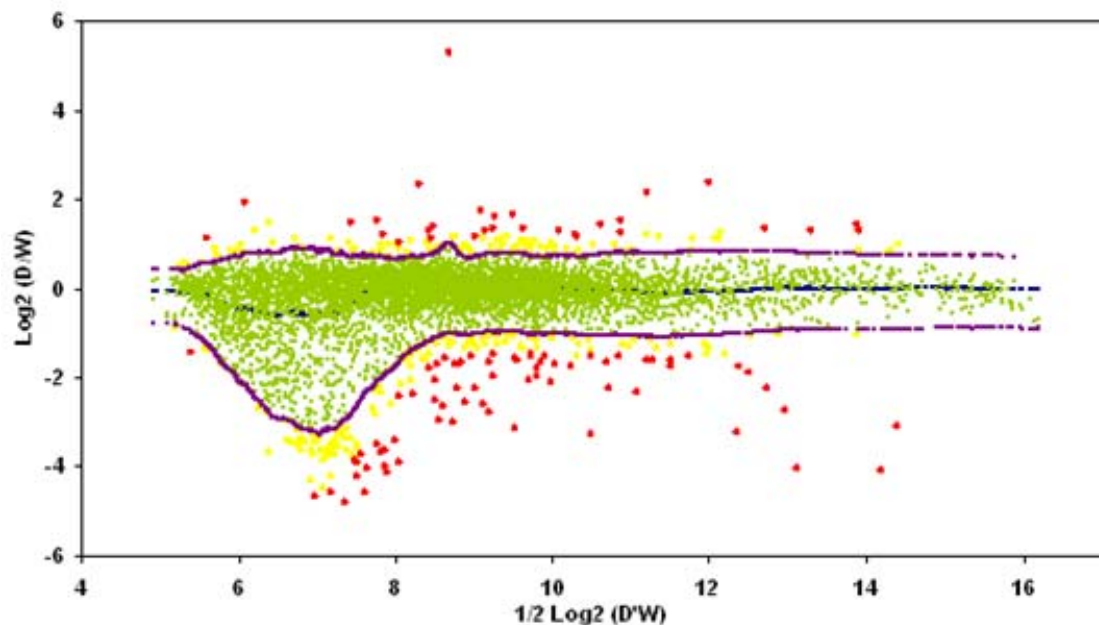


Figura 4.3. Resultados del análisis del transcriptoma. Se representa la intensidad de señal global en ambos canales calculada como el logaritmo de la multiplicación de los valores correspondientes a las cepas W303 (W) y D4567 (D), frente a la relación señales expresada como logaritmo del cociente de las señales D4567/W303. Rojo, genes con valor $z \geq 3$. Amarillo, genes con $3 \geq z \geq 2$. Verde, genes con $z < 2$. Violeta, desviación típica de los valores de cada gen. Azul, media de log-ratio de cada gen.

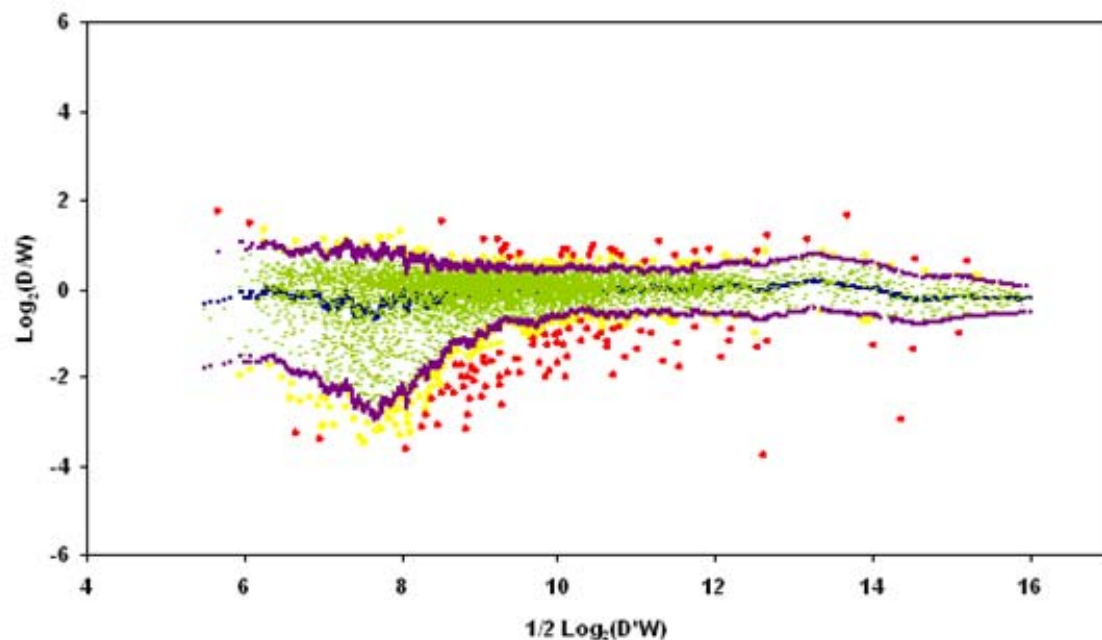


Figura 4.4. Resultados del análisis del traductoma. Se representa la intensidad de señal global en ambos canales calculada como el logaritmo de la multiplicación de los valores correspondientes a las cepas W303 y D4567, frente a la relación señales expresada como el logaritmo del cociente de las señales D4567/W303. Rojo, genes con valor $z \geq 3$. Amarillo, genes con $3 \geq z \geq 2$. Verde, genes con $z < 2$. Violeta, desviación típica de los valores de cada gen. Azul, media de log-ratio de cada gen.

IV.1.1.3. Análisis de datos de oligoarrays.

El análisis inicial de los resultados se llevó a cabo exclusivamente con una selección de genes a partir de aquellos con valores de expresión génica diferencial significativa (valor de z-score igual o superior a 3), en base a diferencias de expresión en D4567 superiores a 2 veces (correspondientes a $\log[\text{ratio}]=\pm 1$) con respecto a W303, y a valores de intensidad de señal superiores a 8,5 para los genes que se reprimen, para así minimizar los efectos de las desviaciones dependientes de (baja) intensidad que sufren los cocientes de señales, como puede apreciarse en las figuras 4.2 y 4.3. Aplicando estos criterios, se obtienen 54 genes con represión transcripcional, 68 con represión traduccional, 31 con activación transcripcional y 12 con activación traduccional (Tabla 4.1). Los niveles de activación de los genes en D4567 muestran rangos de expresión variables en transcriptoma, donde toman valores desde 2,1 hasta 38,6 veces y el 50% de éstos sobrepasan un umbral de 2,6 veces, mientras que los activados en traductoma muestran valores de expresión diferencial comprendidos entre 2,1 y 3,3 veces. Los genes reprimidos en transcriptoma presentan valores de 2,7 a 16,7 veces de sobreexpresión en W303 (o represión en D4567), y el 50% de ellos superan las 3,4 veces. La represión traduccional presenta valores de expresión desde 2 hasta 13 veces mayor en W303 y el 50% de ellos más de 3,2 veces.

Tabla 4.1. Genes con variación significativa en su expresión entre las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* W303 y D4567. Valores de expresión en D4567 con respecto a W303.

Transcripción			Traducción		
Activación	Represión		Activación	Represión	
Orf	LogT*	Zs†	Orf	LogT	zs
AI5_ALFA	5,3	10,7	RPP1A	-4,1	-9,0
HSP12	2,4	5,4	RPP2A	-4,1	-8,7
YCL021W-A	2,3	6,4	PHO84	-3,3	-6,6
YER053C-A	2,2	5,0	PHO11	-3,2	-6,7
BI2	1,9	3,8	PHO12	-3,1	-6,5
TMA10	1,7	4,6	RPP2B	-3,1	-6,8
CHA1	1,6	4,1	CPT1	-3,0	-6,0
IRC20	1,6	4,1	GAP1	-3,0	-5,5
NFS1	1,5	3,6	MEP2	-2,8	-5,8
YLR278C	1,5	3,9	RPP1B	-2,7	-5,9
RED1	1,5	3,0	GOT1	-2,6	-5,0
SNO1	1,5	3,4	SPL2	-2,6	-5,3
YLR262C-A	1,5	3,8	GIT1	-2,5	-5,1
GCV1	1,5	3,6	EMP70	-2,5	-4,5
YPS6	1,4	3,5	COB	-2,3	-4,7
HSP60	1,4	3,2	YIP5	-2,2	-4,4
IMH1	1,3	3,4	MFALFA2	-2,2	-4,7
GSY2	1,3	3,4	GAT1	-2,2	-4,6
VPS34	1,3	3,4	ATP8	-2,2	-4,5
CDC25	1,3	3,4	VTC3	-2,1	-4,3
ACO1	1,3	3,2	PLB2	-2,1	-4,2
PIR3	1,3	3,4	EGT2	-2,1	-3,8
RPS30A	1,3	3,3	OPT1	-2,0	-4,0
YLR294C	1,3	3,0	ZRT1	-2,0	-4,1
PIC2	1,2	3,3	ATP6	-1,9	-3,9
BTN2	1,2	3,3	PHM8	-1,8	-3,7
CYC7	1,2	3,2	SAM3	-1,8	-3,5
ECM22	1,2	3,2	VTC4	-1,8	-3,6
GPX1	1,1	3,0	VTC1	-1,7	-3,6
			MCH2	1,7	3,6
			HSP12	1,6	5,4
			YCL021W-A	1,5	4,4
			SWH1	1,5	3,0
			HSP60	1,2	4,2
			YLR281C	1,1	4,2
			AIF1	1,1	4,1
			ACO1	1,1	3,1
			CHA1	1,1	5,0
			TMA10	1,0	3,9
			HIS3	1,0	4,5
			YMR103C	1,0	4,0
			RPP2A	-3,7	-11,4
			YMR294W-A	-3,2	-5,4
			CPT1	-3,1	-3,9
			RPP1A	-2,9	-10,0
			ATP8	-2,8	-4,8
			HXT6	-2,6	-7,3
			SPG3	-2,5	-4,3
			GOT1	-2,5	-5,2
			YOR365C	-2,4	-3,3
			OST2	-2,4	-4,0
			YCR043C	-2,2	-4,8
			YPR126C	-2,2	-3,9
			YDR089W	-2,2	-3,3
			PHO84	-2,2	-5,3
			LYP1	-2,1	-3,5
			PAU21	-2,0	-3,5
			YDR367W	-2,0	-4,9
			MRH1	-2,0	-7,0
			ORM1	-2,0	-3,2
			ATP6	-2,0	-6,1
			SPL2	-2,0	-6,8
			SNA2	-1,9	-5,3
			VTC2	-1,9	-5,4
			PMT6	-1,9	-3,7
			DPM1	-1,9	-6,0
			ZSP1	-1,8	-3,0
			ENP1	-1,8	-3,0
			PHO11	-1,8	-6,6
			ALG2	-1,7	-3,0

YGL262W	1,1	3,4	AVT1	-1,7	-3,4	GAS3	-1,7	-3,0
YLR281C	1,0	3,0	GPI15	-1,7	-3,2	YLR413W	-1,7	-5,6
			AAD6	-1,7	-3,5	GAP1	-1,7	-3,5
			GAS3	-1,7	-3,4	TOM7	-1,7	-4,7
			FLR1	-1,7	-3,3	NSG2	-1,7	-3,9
			FCY2	-1,7	-3,3	PHM6	-1,6	-3,4
			SWP1	-1,7	-3,5	LEU1	-1,6	-6,3
			VTC2	-1,6	-3,3	AVT6	-1,6	-4,6
			MET14	-1,6	-3,4	GNP1	-1,6	-4,5
			AGP1	-1,6	-3,1	MFALFA2	-1,6	-5,3
			GAS1	-1,6	-3,1	CLB3	-1,6	-5,5
			LEU1	-1,6	-3,1	PMT2C	-1,6	-3,2
			TOM7	-1,6	-3,3	VTC3	-1,5	-5,5
			NSG2	-1,6	-3,1	YCR034W	-1,5	-3,5
			MET17	-1,5	-3,0	MET17	-1,4	-5,4
			FCY22	-1,5	-3,0	RPP1B	-1,4	-4,2
			YJL012C-A	-1,5	-3,0	GDH1	-1,3	-3,9
			YCR034W	-1,5	-3,0	PMP1	-1,3	-4,5
			GAP1	-1,5	-3,0	DYS1	-1,3	-4,4
			MEP1	-1,5	-3,0	YER087C-A	-1,3	-4,0
			PHO8	-1,5	-3,0	PCL9	-1,3	-3,0
			OAC1	-1,5	-3,0	YNL134C	-1,3	-4,4
			GTT2	-1,5	-3,0	YNR034W-A	-1,3	-3,3
			ATX1	-1,5	-3,1	GRE2	-1,2	-4,4
			GDH1	-1,5	-3,0	GTT2	-1,2	-4,1
						OAC1	-1,2	-4,1
						VTC1	-1,2	-3,7
						PHM8	-1,2	-4,2
						PHO12	-1,2	-4,7
						YDL180W	-1,2	-3,0
						ALD5	-1,1	-3,8
						RPC40	-1,1	-3,2
						SNO1	-1,1	-3,4
						MET6	-1,0	-3,0
						RPP2B	-1,0	-3,7
						MET14	-1,0	-4,1
						YJL012C-A	-1,0	-3,6
						AAD6	-1,0	-3,3
						PFS2	-1,0	-3,6

(*)LogT: Log(D4567/W303), (+)zs: valor z-score.

El análisis de los genes que muestran alteraciones diferenciales en su expresión de forma significativa, tanto en el transcriptoma como en el traductoma, ha permitido agruparlos según criterios de localización celular, función que desempeñan y proceso biológico en el que estén implicados, empleando las herramientas de *Gene Ontology* (61). A continuación se relacionan los grupos en los que se han clasificado estos genes.

- Genes de control: las proteínas ácidas, ausentes en el mutante D4567, son un buen control ya que deben comportarse como reprimidas en todo caso. En ningún caso se detectan en D4567.

- Genes de proteínas de localización mitocondrial (tabla 4.2). La mayoría de estos genes presentan el mismo comportamiento en transcripción y en traducción, salvo algunos casos como *AIF1*, gen de una oxidorreductasa mitocondrial reguladora de la apoptosis celular, que se traduce preferentemente por ribosomas sin proteínas ácidas.

COB, gen mitocondrial del citocromo B, y *GAS1*, necesario para la formación de pared celular, aparecen reprimidos en transcripción en D4567 si bien aumentan los niveles de expresión en traducción hasta equilibrarse con W303.

Tabla 4.2. Genes de localización mitocondrial que se expresan de forma diferencial en D4567 con respecto a W303. Se resaltan en rojo los genes con regulación positiva de la traducción en D4567 y en verde los de regulación negativa (positiva en W303).

Expresión	Genes
Activación traduccional	<i>CHA1</i> , <i>HSP60</i> , <i>YLR281C</i> , <i>ACO1</i> , <i>AIF1</i>
Represión traduccional	<i>ATP8</i> , <i>ATP6</i> , <i>MRH1</i> , <i>HXT6</i> , <i>GNP1</i> , <i>ALD5</i> , <i>OAC1</i> , <i>GTT2</i> , <i>TOM7</i> , <i>LYP1</i> , <i>DPM1</i>
Activación transcripcional	<i>AI5_ALPHA</i> , <i>B12</i> , <i>NFS1</i> , <i>CHA1</i> , <i>GCV1</i> , <i>CYC7</i> , <i>PIC2</i> , <i>IRC20</i> , <i>HSP60</i> , <i>YLR281C</i> , <i>ACO1</i>
Represión transcripcional	<i>ATP8</i> , <i>ATP6</i> , <i>COB</i> , <i>OAC1</i> , <i>GTT2</i> , <i>GAS1</i> , <i>TOM7</i>

- Genes implicados en procesos de respuesta a estrés (tabla 4.3). En este caso también se puede observar la presencia repetida de genes en el mismo grupo de activados o reprimidos, tanto en transcripción como en traducción. Los genes cuyos mRNAs se traducen mejor por los ribosomas de D4567 son *ATX1*, gen de una chaperona de cobre con alta afinidad a hierro, y *AIF1*, con funciones de respuesta a presencia de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).

Tabla 4.3. Genes implicados en procesos de respuesta a estrés que se expresan de forma diferencial en el mutante D4567 con respecto a W303. Rojo: Genes con regulación traduccional positiva en D4567. Verde: Regulación negativa.

Expresión	Genes
Activación traduccional	<i>HSP12</i> , <i>AIF1</i>
Represión traduccional	<i>ORM1</i> , <i>GRE2</i>
Activación transcripcional	<i>HSP12</i> , <i>GPX1</i>
Represión transcripcional	<i>ATX1</i>

- Genes implicados en transcripción, traducción, unión a DNA, y ciclo celular. En la tabla 4.4 se muestra los genes con funciones reguladoras que varían su expresión en el mutante. Estos genes aparecen en un número pequeño y no todos muestran una activación traduccional directa, pero son importantes por los posibles efectos reguladores que afecten a la expresión de un mayor número de genes. *GAT1*, activador transcripcional de genes implicados en la represión por catabolito nitrógeno, y *EGT2*, necesario para la separación correcta tras la citoquinesis, aparecen reprimidos en transcripción pero no en traducción en D4567.

Tabla 4.4. Genes reguladores que varían diferencialmente su expresión en el mutante D4567 respecto a W303. Rojo: Genes con regulación traduccional positiva en D4567. Verde: Regulación negativa.

Expresión	Transcripción	Traducción	Unión al ADN	Ciclo celular
Activación traduccional			<i>HSP60, ACO1</i>	
Represión traduccional	<i>RPC40</i>	<i>ENP1, PFS2,</i>		<i>CLB3, PCL9</i>
Activación transcripcional	<i>ECM22</i>	<i>TMA7, RPS30A, BI2</i>	<i>HSP60, ACO1, AI5_ALPHA, VPS34</i>	<i>RED1, CDC25</i>
Represión transcripcional	<i>GAT1</i>			<i>EGT2</i>

- Genes implicados en procesos de transporte. Los genes que se expresan diferencialmente en el mutante y cuyas proteínas desempeñan funciones relacionadas con procesos de transporte se relacionan en la tabla 4.5. Este conjunto de genes muestra un enriquecimiento, estadísticamente significativo, en la presencia de genes relacionados con el transporte de moléculas orgánicas ácidas (traduccionalmente reprimidos en D4567 con respecto a W303), así como genes presentes en vacuola implicados en procesos de microautofagia (transcripcionalmente reprimidos en D4567 con respecto a W303). Entre los genes con diferente comportamiento entre transcripción y traducción muestran activación traduccional *MCH2*, que codifica una permeasa de transporte de ácidos monocarboxílicos a través de la membrana citoplasmática, y *SWH1*, que se localiza en Golgi y en uniones entre núcleo y vacuola.

Tabla 4.5. Genes implicados en proceso de transporte que se expresan diferencialmente en el mutante D4567 respecto a W303. Rojo: activados en traducción. Verde: reprimidos en traducción.

Expresión	Genes
Activación traduccional	<i>SWH1, MCH2, HSP60</i>
Represión traduccional	<i>ATP8, ATP6, PMP1, FEN1, HXT6, GNP1, VTC1, AVT6, VTC2, OAC1, GAP1, PHO84, GOT1, TOM7, LYP1, VTC3</i>
Activación transcripcional	<i>PIC2, BTN2, VPS34, HSP60, IMH1</i>
Represión transcripcional	<i>ATP8, ATP6, FEN1, VTC1, VTC2, COB, FLR1, AGP1, GIT1, FCY2, FCY22, ZRT1, MEP1, OPT1, AVT1, OAC1, GAP1, PHO84, PTR2, TOM7, MEP2, SAM3, YIP5, VTC4, GOT1, ATX1, VTC3</i>

- Genes sin función conocida. En la tabla 4.6 se recogen los genes para los que no se conoce una función, y que han visto alterada su expresión en el mutante. Solo un pequeño número de genes en este grupo parece aumentar su expresión entre transcripción y traducción en el mutante D4567 con respecto a la cepa silvestre W303.

Tabla 4.6. Genes sin función conocida que muestran expresión diferencial en el mutante. Rojo: Genes con regulación traduccional positiva en D4567. Verde: Regulación negativa.

Expresión	Genes
Activación traduccional	YCL021W-A, HSP12, YLR281C, TMA10, YMR103C
Represión traduccional	YJL012C-A, ZSP1 , YCR043C , YDL180W , MRH1 , YDR089W , PHM6 , YDR367W , SPG3 , SNA2 , PHM8, VTC1, YER087C-A , VTC2, ORM1 , YLR413W , YML131W , GOT1, PAU21 , VTC3, YPR126C , PHO12, GAS3, YMR294W-A , YNL134C , YNR034W-A , YOR365C
Activación transcripcional	YCL021W-A, YER053C-A , HSP12, YGL262W , IRC20 , TMA7 , YLR278C , YLR281C, YLR294C , IMH1 , TMA10, SNO1 , YPS6
Represión transcripcional	YJL012C-A, PHM8, VTC1, VTC2, VTC4 , EMP70 , GOT1, VTC3, FCY22 , PHO12, GAS3

- Genes del sistema PHO de regulación del metabolismo del fosfato. Una mayoría de genes pertenecientes al regulón del fosfato, entre los que se encuentran los principales efectores y transportadores, muestran una represión de su expresión en D4567 tanto en transcripción como en traducción (ver tabla 4.7). *PIC2*, transportador mitocondrial de fosfato, está activado en el transcriptoma de D4567 y parece regularse negativamente. Algunos genes PHO muestran regulación traduccional positiva, como *VTC4*, implicado en la acumulación de polifosfatos en vacuola, *PHO8*, gen de una fosfatasa alcalina localizada en vacuola, y *GIT1*, permeasa cuya expresión y actividad están reguladas por fosfato e inositol. La ruta está reprimida en casi su totalidad, exceptuando al regulador transcripcional de la propia ruta, *PHO4*, que permanece invariante y al transportador de fosfato inorgánico asociado a mitocondria, *PIC2*, que se activa en el mutante D4567.

Tabla 4.7. Genes reguladores de la ruta metabólica del fosfato.

Expresión	Genes
Activación traduccional	
Represión traduccional	PHO11, PHO12, PHM6 , VTC1, VTC2, VTC3, PHO84, PHM8, SPL2
Activación transcripcional	PIC2
Represión transcripcional	PHO11, PHO12, PHO8 , VTC1, VTC2, VTC3, VTC4 , PHO84, PHM8, SPL2, GIT1

- Genes de tipo sexual o *mating*. Se pudieron observar diferencias en la expresión de genes implicados en los mecanismos sexuales, a pesar de que W303 y D4567 tienen el mismo tipo sexual, como *MF(Alpha)2*, uno de los dos que codifican la feromona o factor de conjugación α , que está fuertemente reprimido tanto en transcripción como en traducción.

El objetivo principal de este trabajo es encontrar genes cuyos mRNAs muestren una regulación positiva en la traducción en D4567 de forma diferencial a la de W303. Los genes que mejor se ajustan a esta condición son aquellos que se transcriben de forma

similar en W303 y D4567 y se traducen más en el mutante, lo que indica que la transcripción no se ve afectada, y los efectos de la regulación únicamente actúan en la traducción. Otros tipos de comportamiento de la expresión génica que se pueden interpretar como una regulación positiva de la traducción en D4567 son los que muestran los genes que se transcriben menos pero se traducen igual, y el de los genes que se transcriben menos pero se traducen más. En ambos casos D4567 posee una población de mRNAs transcritos menor que la de W303, que sin embargo resulta en niveles de traducción equiparables o superiores.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de los oligoarrays realizado en la Unidad de Bioinformática, según se ha comentado más arriba, se han encontrado genes que presentan cierto grado de activación traduccional, puesto que su traducción aumenta en el mutante con respecto al control pero no su transcripción y genes con represión transcripcional de mensajeros que se traducen neutralmente. Estos genes activados se relacionan en la tabla 4.9B/C.

Asimismo, la ausencia de proteínas ácidas en el tallo ribosómico de D4567 conlleva la regulación negativa de determinados genes, que serían traducidos preferentemente por ribosomas con proteínas ácidas en el tallo, mostrando por tanto una regulación positiva en la traducción en W303 de forma diferencial a la de D4567. Los genes que presentan una regulación negativa en el mutante sin proteínas ácidas podrían ser responsables del fenotipo que diferencia a D4567 y W303, y el modelo de regulación propuesto se puede extender a esta condición: son genes cuya regulación diferencial también está modulada por la composición del tallo y son traducidos preferentemente por ribosomas con diferente dotación de proteínas ácidas, que en este caso corresponde a la completa, propia de W303. Los genes que parecen estar regulados de forma diferencial y positiva en la cepa silvestre, siguiendo los mismos criterios que en el D4567, son los que muestran represión traduccional sin una represión transcripcional correspondiente y aquellos cuya activación transcripcional en D4567 no se refleja en una activación traduccional. Estos genes reprimidos en traducción en D4567 se relacionan en la tabla 4.9B/C.

Los genes indicados más arriba, a los que se les estima una regulación traduccional en D4567 diferente a la que presentan en W303, muestran valores de expresión cercanos al límite de confianza, por lo que deben ser tomados con reservas. Dicha reserva se debe a que el criterio tomado hasta el momento para considerar regulado a un gen es la presencia de valores de expresión únicamente en transcriptoma o traductoma y que éstos cumplan a su vez los criterios para considerarlos válidos (diferencias de 2 veces o más, y $z \geq 3$). Sin embargo, es posible que el valor de expresión aceptado en transcriptoma o traductoma esté próximo al descartado en traductoma o transcriptoma respectivamente, y que por tanto, fisiológicamente no exista tal regulación. En contraste,

la mayoría de genes con valores de expresión diferencial más altos, que darían unos resultados de regulación más fiables, están presentes tanto en transcriptoma como en traductoma por lo que no se consideran como regulados en este análisis (tabla 4.8).

Tabla 4.8. Efectos represores de la expresión génica en D4567 debidos a la ausencia de proteínas ácidas.

ORF	Gen	Transcripción	Traducción
YFL014W	HSP12	5,1	3,1
YCL021W-A	YCL021W-A	5,0	2,8
YLR327C	TMA10	3,3	2,0
YCL064C	CHA1	3,1	2,1
YLR259C	HSP60	2,6	2,3
YLR304C	ACO1	2,5	2,1
YLR281C	YLR281C	2,1	2,2
YOR375C	GDH1	-2,8	-2,5
YLL060C	GTT2	-2,8	-2,3
YKL120W	OAC1	-2,8	-2,3
YCR034W	FEN1	-2,9	-2,8
YJL012C-A	VTC4	-2,9	-2,0
YLR303W	MET17	-2,9	-2,6
YNL156C	NSG2	-3,0	-3,1
YNL070W	TOM7	-3,0	-3,2
YGL009C	LEU1	-3,0	-3,1
YKL001C	MET14	-3,1	-2,0
YFL004W	VTC2	-3,1	-3,7
YMR215W	GAS3	-3,2	-3,3
YFL056C	AAD6	-3,2	-2,0
YER072W	VTC1	-3,3	-2,3
YER037W	PHM8	-3,5	-2,3
Q0085	ATP6	-3,7	-4,0
YPL019C	VTC3	-4,3	-2,9
Q0080	ATP8	-4,7	-7,2
YGL089C	MFALFA2	-4,7	-3,0
YHR136C	SPL2	-6,1	-3,9
YMR292W	GOT1	-6,2	-5,5
YKR039W	GAP1	-7,8	-3,2
YNL130C	CPT1	-8,0	-8,4
YHR215W	PHO12	-8,7	-2,3
YAR071W	PHO11	-9,4	-3,4
YML123C	PHO84	-9,7	-4,6

Para facilitar la interpretación visual de los resultados en este trabajo, los cocientes que sean menores de la unidad, correspondientes a una disminución relativa de la expresión génica en D4567, han sido transformados para convertirlos en enteros negativos mediante la ecuación $Y = -1/X$, donde:

Y: Valor de expresión transformado.

X: Valor de expresión asimétrico.

Así, cocientes que significan el doble de expresión en W303 con respecto a D4567 pasarán de 0,5 veces a -2 veces, y así sucesivamente, sin alterar el significado biológico.

En el caso de los genes identificados tanto en transcriptoma como en traductoma se puede hablar de enriquecimiento diferencial en la traducción en D4567 para aquellos genes activados en transcriptoma y traductoma, pero con una mayor activación en este último, y genes más reprimidos en transcriptoma que en traductoma. Este tipo de regulación diferencial a nivel traduccional en D4567 sólo puede determinarse para aquellos genes que presenten datos estadísticamente significativos de expresión en transcriptoma y en traductoma, mediante el cálculo del cociente de estos valores. La interpretación de resultados debe hacerse con cautela debido al carácter semicuantitativo de la propia técnica, sobre todo en los casos de bajos niveles de expresión. Se han realizado los cálculos relacionando matemáticamente los valores de expresión traduccional y transcripcional de genes con $z \geq 3$ y diferencias de expresión de al menos 2 veces en oligoarrays (recogidos en las tablas 4.1 y 4.8), obteniéndose los resultados presentados en la tabla 4.9A, donde se recogen todos los genes con regulación cuantitativa de al menos 1,5 veces. El significado biológico de la comparación de estos valores es la variación de la regulación de la traducción corregida por la cantidad de mRNA transcrito. Se puede observar que los valores de regulación traduccional obtenidos son bastante bajos, encontrándose sólo un pequeño grupo de genes con valores de regulación superiores a 2 veces. En este análisis preliminar, el número de genes regulados diferencialmente en traducción de D4567 vs. W303 corresponde a aquellos que aparecen sólo en las tablas de transcripción o traducción. Según se ha indicado, estos genes tienen niveles de expresión bajos y valores de z-score cercanos a 3, y se observó que la tendencia de los valores de expresión obtenidos para estos mismos genes, pero con significación estadística menor ($3 > z \geq 2$, recogidos en las tablas A.1 y A.2) no contemplados para el análisis, era similar a la de los valores aceptados. Por tanto, la regulación traduccional asumida para estos genes hasta este punto, no existiría como tal.

Por esta razón se decidió ensayar con otros sistemas de microarrays para dar una mayor robustez a los resultados de expresión génica diferencial y/o regulación traduccional diferencial en el mutante D4567, y aceptar la tendencia mostrada por los genes con valores de expresión en el límite de confianza ($3 > z \geq 2$) en los cálculos de regulación traduccional.

Tabla 4.9. Regulación traduccional diferencial en D4567. Regulación diferencial de la expresión génica en D4567 a nivel de la traducción, obtenida en los experimentos con YG1.1. Rojo: Relación positiva traducción/transcripción (regulación positiva) superior a 1,5 veces en D4567. Verde: Relación positiva traducción/transcripción superior a 1,5 veces en W303 (regulación negativa en D4567). A: Genes con expresión alterada en transcriptoma y traductoma. B: Genes que alteran su expresión sólo en transcripción. C: Genes que sólo alteran su expresión en traducción.

A			B			C		
ORF	Gen	Reg*	ORF	Gen	Reg	ORF	Gen	Reg
YHR215W	PHO12	3,9	Q0070	AI5_ALFA	Rep†	YKL221W	MCH2	Act‡
YAR071W	PHO11	2,7	YER053C-A	YER053C-A	Rep	YAR042W	SWH1	Act
YKR039W	GAP1	2,4	Q0110	BI2	Rep	YNR074C	AIF1	Act
YML123C	PHO84	2,1	YLR247C	IRC20	Rep	YOR202W	HIS3	Act
YFL056C	AAD6	1,6	YCL017C	NFS1	Rep	YMR103C	YMR103C	Act
YGL089C	MFALFA2	1,6	YLR278C	YLR278C	Rep	YNL317W	PFS2	Rep
YHR136C	SPL2	1,6	YLR263W	RED1	Rep	YER091C	MET6	Rep
YKL001C	MET14	1,5	YMR095C	SNO1	Rep	YML131W	SNO1	Rep
YER037W	PHM8	1,5	YLR262C-A	TMA7	Rep	YPR110C	RPC40	Rep
YPL019C	VTC3	1,5	YDR019C	GCV1	Rep	YER073W	ALD5	Rep
YER072W	VTC1	1,5	YIR039C	YPS6	Rep	YDL180W	YDL180W	Rep
YCL064C	CHA1	0,7	YLR309C	IMH1	Rep	YOL151W	GRE2	Rep
Q0080	ATP8	0,7	YLR258W	GSY2	Rep	YNR034W-A	YNR034W-A	Rep
YFL014W	HSP12	0,6	YLR240W	VPS34	Rep	YNL134C	YNL134C	Rep
YLR327C	TMA10	0,6	YLR310C	CDC25	Rep	YDL179W	PCL9	Rep
YCL021W-A	YCL021W-A	0,5	YKL163W	PIR3	Rep	YER087C-A	YER087C-A	Rep
			YLR287C-A	RPS30A	Rep	YHR068W	DYS1	Rep
			YLR294C	YLR294C	Rep	YCR024C-A	PMP1	Rep
			YER053C	PIC2	Rep	YAL023C	PMT2	Rep
			YGR142W	BTN2	Rep	YDL155W	CLB3	Rep
			YEL039C	CYC7	Rep	YDR508C	GNP1	Rep
			YLR228C	ECM22	Rep	YER119C	AVT6	Rep
			YKL026C	GPX1	Rep	YDR281C	PHM6	Rep
			YGL262W	YGL262W	Rep	YLR413W	YLR413W	Rep
			YGR121C	MEP1	Act	YGL065C	ALG2	Rep
			YNL259C	ATX1	Act	YBR247C	ENP1	Rep
			YDR481C	PHO8	Act	YBR287W	ZSP1	Rep
			YKR093W	GAP1	Act	YPR183W	DPM1	Rep
			YER060W-A	FCY22	Act	YGR199W	PMT6	Rep
			YMR307W	GAS1	Act	YDR525W-A	SNA2	Rep
			YCL025C	AGP1	Act	YGR038W	ORM1	Rep
			YMR149W	SWP	Act	YDR033W	MRH1	Rep
			YER056C	FCY2	Act	YDR367W	YDR367W	Rep
			YBR008C	FLR1	Act	YOR394W	PAU21	Rep
			YNL038W	GPI15	Act	YNL268W	LYP1	Rep
			YJR001W	AVT1	Act	YDR089W	YDR089W	Rep
			YJL012C	VTC4	Act	YPR126C	YPR126C	Rep
			YPL274W	SAM3	Act	YCR043C	YCR043C	Rep
			YGL255W	ZRT1	Act	YOR103C	OST2	Rep
			YJL212C	OPT1	Act	YOR365C	YOR365C	Rep
			YMR006C	PLB2	Act	YDR504C	SPG3	Rep
			YNL327W	EGT2	Act	YDR343C	HXT6	Rep
			YFL021W	GAT1	Act	YMR294W-A	YMR294W-A	Rep
			YGL161C	YIP5	Act			
			Q0105	COB	Act			
			YLR083C	EMP70	Act			
			YCR098C	GIT1	Act			
			YNL142W	MEP2	Act			

*Regulación traduccional diferencial en D4567 con respecto a W303.

†Represión/Regulación negativa. ‡Activación/Regulación positiva.

IV.1.1.4. Análisis con almaZen.

Se realizó un análisis alternativo de expresión génica diferencial empleando el programa de análisis de datos de microarrays almaZen (Bioalma) (20, 47). De esta forma se pueden obtener resultados de forma independiente en el laboratorio a partir de los datos de microarrays, con un programa que permite hacer diferentes análisis, manipulaciones de los datos y presentaciones de resultados. Se analizaron tres experimentos con oligoarrays de transcriptoma, número suficiente de replicas para obtener resultados significativos (92). Se consideraron regulados los genes que mostraban, simétricamente, diferencias de al menos 2 veces la desviación estándar de la población, valores de z-score superiores a 2 (en zona de incertidumbre hasta alcanzar $z=3$), y una intensidad mínima de 20, encontrándose 17 activados y 38 reprimidos. Los resultados de este tipo de análisis mostraron un menor número de genes con alteración en la expresión génica en D4567 de forma diferencial a W303, si bien la comparación con los obtenidos por la Unidad de Bioinformática con oligoarrays y las otras plataformas de biochips mostró que se mantenía la tendencia observada en el análisis anterior.

IV.1.2. OTROS SISTEMAS DE MICROARRAYS.

Se llevó a cabo un análisis de expresión génica en transcriptoma y traductoma de D4567 frente a W303 mediante hibridaciones en otras plataformas de biochips de cDNA y Affymetrix, tomando como significativos los genes que cumplían las mismas condiciones que en el caso de oligoarrays YG1.1: valor $z \geq 3$ y diferencias de expresión de al menos 2 veces. En el caso de genes que carecían de valores significativos en alguna de las tres plataformas, se buscó entre los datos de origen el valor de expresión que presentaban y se les asignó siempre que fuese $z \geq 2$.

IV.1.2.1. Microarrays de cDNA.

Los biochips de cDNA fueron fabricados por el Microarray Centre (Canadá). Se hibridaron 5 microarrays para analizar el transcriptoma de D4567 frente al de W303, de los que se seleccionaron 3 para su posterior análisis en base a la inspección visual de gráficos RI-MA, y 4 para el traductoma de los que se analizaron 3 por el mismo procedimiento. Éstos biochips se sometieron al mismo tipo de procesado por la Unidad de Bioinformática. En la figura 4.5 se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis del transcriptoma y en la figura 4.6 los de traductoma pudiéndose observar la morfología afilada que adoptan la mayoría de perfiles génicos (sin expresión diferencial), rebasada únicamente por los diferencialmente expresados. Los resultados de las tablas 4.10 a 4.13 muestran los genes con valores $z \geq 3$, o asignados con $3 > z \geq 2$, y diferencias de expresión superiores a 2 veces ($\log[\text{ratio}] = \pm 1$). Todos los valores de expresión génica diferencial con $z \geq 2$ obtenidos en los análisis de transcriptoma y traductoma realizados con esta

plataforma se recogen en las tablas A.3 y A.4 del apéndice.

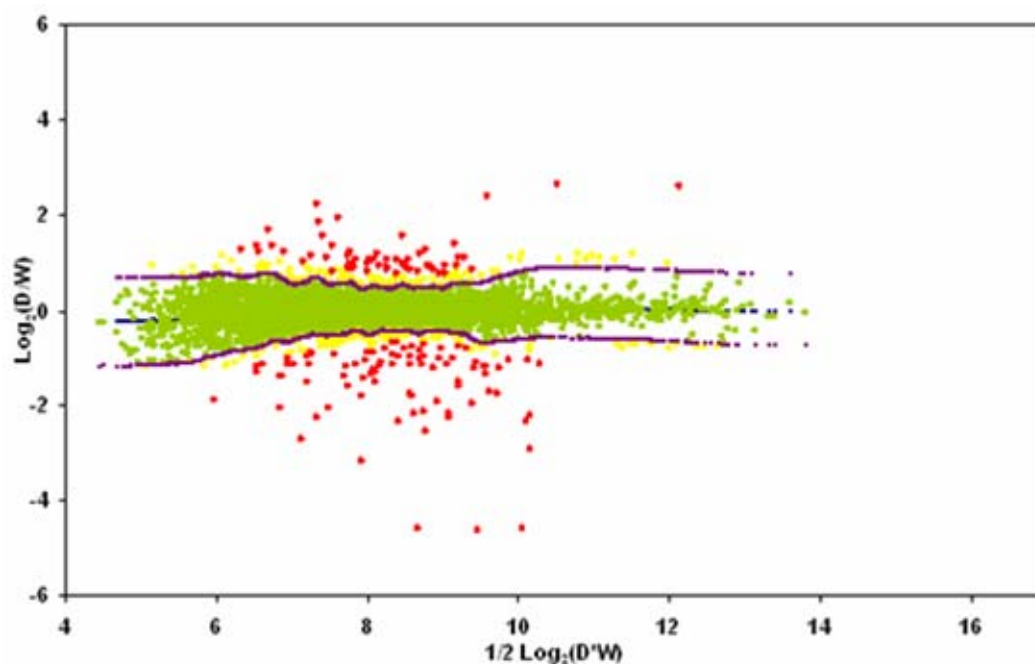


Figura 4.5. Resultados del análisis de transcriptoma de D4567 frente a W303 en biochips de cDNA. Se representa la intensidad de señal global en ambos canales, calculada como el logaritmo de la multiplicación de los valores correspondientes a las cepas W303 (W) y D4567 (D), frente a la relación señales, expresada como logaritmo del cociente de las señales D4567/W303. Rojo, genes con valor $z \geq 3$. Amarillo, genes con $3 > z \geq 2$. Verde, genes con $z < 2$. Violeta, desviación típica de los valores de cada gen. Azul, media de log-ratio de cada gen.

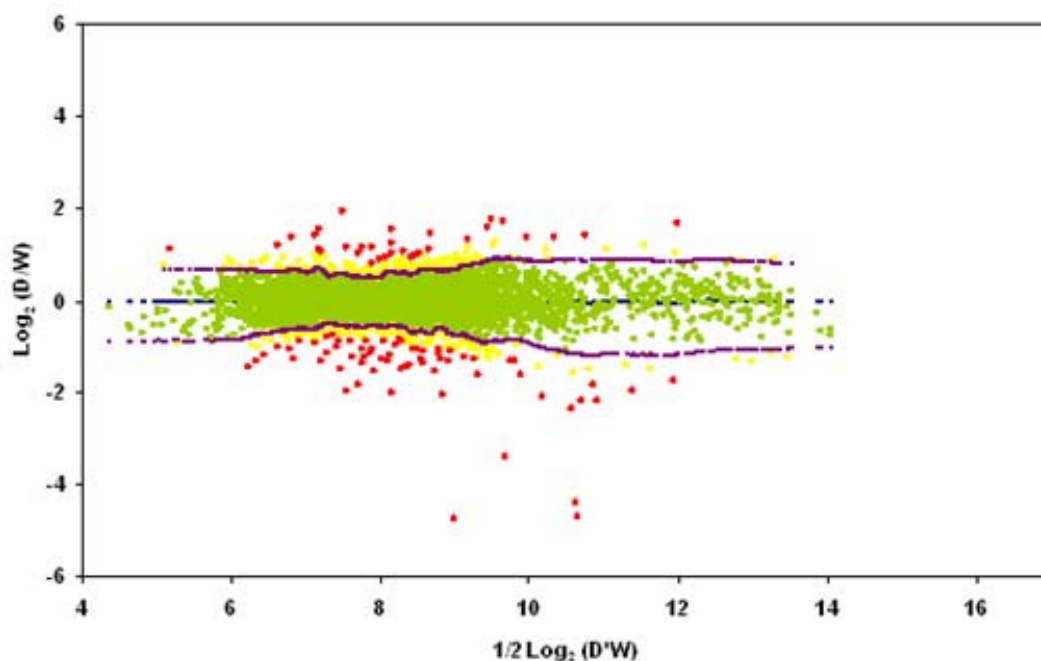


Figura 4.6. Resultados del análisis de traductoma de D4567 frente a W303 en biochips de cDNA. Se representa la intensidad de señal global en ambos canales, calculada como el logaritmo de la multiplicación de los valores correspondientes a las cepas W303 (W) y D4567 (D), frente a la relación señales, expresada como logaritmo del cociente de las señales D4567/W303. Rojo, genes con valor $z \geq 3$. Amarillo, genes con $3 > z \geq 2$. Verde, genes con $z < 2$. Violeta, desviación típica de los valores de cada gen. Azul, media de log-ratio de cada gen.

IV.1.2.2. Microarrays de Affymetrix.

Se enviaron dos muestras de mRNA transcrito total y dos de asociado a polisomas al Centro de Investigación del Cáncer en Salamanca, donde fueron ensayadas con tecnología de Affymetrix. Los resultados, genes con valores $z \geq 3$ o asignados con $z \geq 2$ y diferencias de expresión superiores a 2 veces ($\log[\text{ratio}] = \pm 1$), se muestran en las tablas 4.9 y 4.10. Todos los valores de expresión génica diferencial con $z \geq 2$ obtenidos en los análisis de transcriptoma y traductoma realizados con esta plataforma se recogen en las tablas A.5 y A.6 del apéndice.

IV.1.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TODAS LAS PLATAFORMAS.

Los resultados cuantitativos obtenidos por los diferentes sistemas de microarrays empleados no son comparables entre sí directamente, debido a las diferencias en las muestras, en las sondas, y además, en el caso de Affymetrix, en el propio sistema de hibridación, empleo de fluoróforos, medidas y procesamiento de datos. En las tablas 4.10 y 4.11 se muestra un resumen de las principales características de los datos globales obtenidos en las tres plataformas de microarrays empleadas contemplando únicamente genes nucleares debido a la divergencia existente en los genes mitocondriales recogidos en cada una de las plataformas. En todas ellas se observa que el número de genes reprimidos es aproximadamente el doble, o más, que el de activados y que presentan valores de expresión en torno a 4 veces más o incluso superiores. Sin embargo, los valores máximos alcanzados entre los diferentes grupos de expresión génica son fluctuantes entre biochips y dentro de una misma plataforma. Los valores más altos de activación y represión se obtienen en la plataforma YGS98 tanto en transcriptoma como en traductoma, mientras que los más compactos en ambos conjuntos se observan en los YG1.1. Los valores de expresión que se encuentran en un rango más comparable entre transcripción y traducción se obtienen en los biochips de cDNA (Y64K), con valores máximos de represión del mismo orden y diferencias entre los activados de 1,6 veces, muy similares al caso de YGS98, con valores máximos de activación del mismo orden y diferencias de represión de 1,7 veces. En el caso de YGS98 se observa un menor número total de genes alterados en relación a los que se obtienen en el conjunto de los grupos de expresión, lo que indica el mayor índice de correspondencia entre los genes alterados en transcriptoma y en traductoma, puesto que la gran mayoría de genes con expresión alterada en transcripción también ven alterada su expresión en traducción.

Tabla 4.10. Estadística general de microarrays (I). Número de genes que muestran expresión diferencial entre D4567 y W303 en cada plataforma de microarrays, y total de genes con expresión alterada detectados en la plataforma. YG1.1: oligoarrays Yeast GeneList V1.1. Y64K: biochips de cDNA Yeast 6,4K4. YGS98: Affymetrix.

Expresión		YG1.1	Y64K	YGS98
Transcripción	Activación	31	35	30
	Represión	54	71	74
Traducción	Activación	12	29	47
	Represión	68	59	81
Total		129	164	129

Tabla 4.11. Estadística general de microarrays (II). Valores máximos de expresión diferencial entre D4567 y W303 encontrados en cada plataforma de microarrays. YG1.1: oligoarrays Yeast GeneList V1.1. Y64K: biochips de cDNA Yeast 6,4K4. YGS98: Affymetrix.

		YG1.1	Y64K	YGS98
Transcripción	Activación	5,1	6,1	14,9
	Represión	-16,7	-24,2	-104
Traducción	Activación	3,3	3,7	13,9
	Represión	-13,0	-26	-59,7

En las tablas 4.12 y 4.13 se relacionan todos los genes que se expresan diferencialmente en transcriptoma y/o traductoma, y que se detectan al menos en dos de las tres plataformas empleadas, después de la asignación de valores con $z \geq 2$.

Tabla 4.12. Genes inducidos en todas las plataformas. Se indica el cambio de expresión en D4567 en referencia a W303. YG1.1: oligoarrays Yeast Genome V1.1. Y64K: biochips de cDNA Yeast 6,4K4. YGS98: Affymetrix. *Rojo*: genes sobreexpresados en D4567. *Verde*: Genes sobreexpresados en W303. *Azul*: valores procedentes de datos originales con $3 > z \geq 2$.

		Transcripción					Traducción		
Orf	Gen	YG1.1	Y64K	YGS98	Orf	Gen	YG1.1	Y64K	YGS98
Q0070	AI5_ALPHA	38,7	no lista*	5,0	YFL014W	HSP12	3,1	3,3	nd
YFL014W	HSP12	5,1	2,9	1,9	YLR411W	CTR3	2,9	2,8	8,4
YCL021W-A	YCL021W-A	5,0	1,1	nd	YLR265C	NEJ1	2,4	1,6	2,3
Q0110	BI2	3,8	no lista	nd	YLR259C	HSP60	2,3	1,9	1,7
YLR327C	TMA10	3,3	nd+	nd	YLR281C	YLR281C	2,2	1,6	3,3
YCL064C	CHA1	3,1	2,3	nd	YNR074C	AIF1	2,2	2,1	14,1
YLR247C	IRC20	3,0	1,6	2,6	YLR304C	ACO1	2,1	nd	2,8
YCL017C	NFS1	2,9	1,9	2,8	YGL212W	VAM1	2,0	nd	2,4
YLR278C	YLR278C	2,8	1,5	2,1	YLR327C	TMA10	2,0	nd	2,5
YLR263W	RED1	2,8	1,7	nd	YOR202W	HIS3	2,0	2,2	5,6
YDR019C	GCV1	2,7	2,0	2,3	YBL106C	SRO77	1,9	2,2	nd
YLR259C	HSP60	2,6	2,3	nd	YLR239C	LIP2	1,9	nd	2,7
YLR309C	IMH1	2,5	2,6	2,1	YAL044C	GCV3	1,7	2,5	nd
YLR258W	GSY2	2,5	2,1	nd	YCL017C	NFS1	1,6	2,8	6,3
YLR240W	VPS34	2,5	nd	2,0	YLR274W	CDC46	1,6	2,2	2,9
YLR310C	CDC25	2,5	1,6	1,9	YLR280C	YLR280C	1,6	2,2	3,5
YLR304C	ACO1	2,5	2,1	nd	YLR247C	IRC20	1,5	nd	2,5
YKL163W	PIR3	2,4	nd	2,6	YLR276C	DBP9	1,5	2,6	2,3
YLR294C	YLR294C	2,4	1,6	nd	YLR309C	IMH1	1,5	2,6	2,0
YER053C	PIC2	2,3	2,4	nd	YLR319C	BUD6	1,5	3,8	2,3
YLR289W	GUF1	2,3	2,0	nd	YNL036W	NCE103	1,5	3,3	nd
YLR228C	ECM22	2,2	nd	2,5	YLR228C	ECM22	1,4	nd	2,4

YAL044C	GCV3	2,1	2,3	nd	YLR266C	PDR8	1,4	2,2	nd
YLR239C	LIP2	2,1	nd	2,1	YLR298C	YHC1	1,4	1,6	2,4
YLR270W	DCS1	2,1	2,3	2,1	YLR275W	FAS1	1,3	2,4	2,9
YLR336C	SGD1	2,1	1,7	2,7	YLR238W	FAR10	nd	3,2	2,0
YLR281C	YLR281C	2,1	1,5	3,0	YLR261C	VPS63	nd	2,0	1,9
YIL080W	YIL080W	2,0	1,4	3,0	YOR203W	YOR203W	nd	2,0	5,2
YJL108C	unknown	2,0	nd	2,0	YLR323C	CWC24	nd	2,0	2,0
YLR274W	CDC46	2,0	2,1	3,4	YBR244W	GPX2	nd	1,9	2,4
YLR280C	YLR280C	2,0	nd	3,0	YLR243W	YLR243W	nd	1,7	2,4
YLR280C	YLR280C	2,0	nd	3,7	YLR316C	TAD3	nd	1,7	2,6
YLR261C	VPS63	1,9	2,1	nd	YLR326W	YLR326W	nd	1,4	3,0
YLR262C	YPT6	1,9	2,1	nd					
YOR202W	HIS3	1,9	2,2	11,7					
YOR190W	SPR1	1,7	2,1	nd					
YEL021W	URA3	1,7	2,2	nd					
YLR411W	CTR3	1,7	4,7	14,8					
YLR243W	YLR234W	1,6	1,9	2,9					
YLR318W	EST2	1,6	2,0	nd					
YLR276C	DBP9	1,6	2,1	2,3					
Q0275	COX3	nd	no lista	5,4					
YNR074C	AIF1	nd	3,9	10,8					
YLR242C	ARV1	nd	2,6	2,3					
YLR313C	SPH1	nd	2,2	2,0					
YLR316C	TAD3	nd	2,1	2,1					
YLR237W	THI7	nd	2,0	2,7					
YKRO76W	ECM4	nd	2,0	-4,6					

*no lista: el biochip no presenta muestras para ese gen.

†nd: No diferencial: genes sin expresión diferente entre D4567 y W303.

Tabla 4.13. Genes reprimidos en todas las plataformas. Se indica el cambio de expresión en D4567 en referencia a W303. YG1.1: oligoarrays Yeast GeneList V1.1. Y64K: biochips de cDNA Yeast 6,4K4. YGS98: Affymetrix. *Rojo*: genes sobreexpresados en D4567. *Verde*: genes sobreexpresados en W303. *Azul*: valores procedentes de datos originales con $3 > z_s \geq 2$.

TRANSCRIPTOMA					TRADUCTOMA				
ORF	Gen	YG1.1	Y64K	YGS98	ORF	Gen	YG1.1	Y64K	YGS98
YDL081C	RPP1A	-16,8	-4,5	-35,9	YOL039W	RPP2A	-13,3	-26,3	-30,5
YOL039W	RPP2A	-16,6	-24,6	-62,6	YDL081C	RPP1A	-7,6	-10,6	-28,7
YDR281C	PHM6	-10,6	-1,9	-10,7	Q0080	ATP8	-7,2	no lista	nd
YML123C	PHO84	-9,7	-7,7	-20,3	YJR079W	YJR079W	-6,5	nd	-3,7
YAR071W	PHO11	-9,4	-9,2	-15,7	YDR089W	YDR089W	-4,6	-1,6	nd
YHR215W	PHO12	-8,7	-5	no lista	YML123C	PHO84	-4,6	-1,7	-27,3
YDR382W	RPP2B	-8,4	-24,2	-71	Q0085	ATP6	-4	no lista	nd
YKRO39W	GAP1	-7,8	nd†	-28	YHR136C	SPL2	-3,9	-2	-31,8
YNL142W	MEP2	-6,9	-4,1	-5,9	YFL004W	VTC2	-3,7	-2	-1,9
YDL130W	RPP1B	-6,6	-23,8	-59,4	YPR183W	DPM1	-3,6	-1,5	nd
YHR136C	SPL2	-6,1	-3,4	-26,6	YAR071W	PHO11	-3,4	-4	-8,3
YCR098C	GIT1	-5,8	-6,6	-29,9	YKRO39W	GAP1	-3,2	nd	-18,9
Q0105	COB	-5,1	no lista*	nd	YDR281C	PHM6	-3,1	nd	-15
YGL089C	MF(ALPHA)2	-4,7	-4,7	-5,4	YGL009C	LEU1	-3,1	-2,6	-4,8
YFL021W	GAT1	-4,7	-1,7	-4,6	YGL089C	MF(ALPHA)2	-3	-4,5	-4,6
Q0080	ATP8	-4,7	no lista	nd	YPL019C	VTC3	-2,9	-2,5	-6
YPL019C	VTC3	-4,3	-4,5	-6,8	YOR313C	SPS4	-2,8	-2,5	-2,8
YMR006C	PLB2	-4,2	-1,5	-5,5	YLR303W	MET17	-2,6	-4,1	-3,7
YJL212C	OPT1	-4	-1,5	-2,3	YDL130W	RPP1B	-2,6	-26,7	-26,9
YGL255W	ZRT1	-3,9	nd	-2,5	YOR375C	GDH1	-2,5	-4,5	nd
Q0085	ATP6	-3,7	no lista	nd	YDL179W	PCL9	-2,4	-1,7	nd
YERO37W	PHM8	-3,5	-4,1	-6,1	YNL134C	YNL134C	-2,4	-5,2	-4
YLL061W	MMP1	-3,5	-2,3	nd	YNR034W-A	YNR034W-A	-2,4	nd	-5,8
YPL171C	OYE3	-3,5	-2,3	-11,5	YOL151W	GRE2	-2,4	-2,2	-3,2
YPL274W	SAM3	-3,4	-2	-2,6	YLL060C	GTT2	-2,3	nd	-16,7

YJL012C	VTC4	-3,4	-2,2	-3,9	YKL120W	OAC1	-2,3	-2,4	-4,8
YER072W	VTC1	-3,3	-2,3	-3,4	YER072W	VTC1	-2,3	-2,1	-2,3
YFL056C	AAD6	-3,2	-1,5	-7,3	YER037W	PHM8	-2,3	-3,9	-8,2
YBR008C	FLR1	-3,2	nd	-2,9	YHR215W	PHO12	-2,3	-2,6	no lista
YFL004W	VTC2	-3,1	-2,1	-2	YGL037C	PNC1	-2,2	-2,1	nd
YKL001C	MET14	-3,1	-2,1	-6,6	YML131W	YML131W	-2,1	-2,1	-3,9
YCL025C	AGP1	-3	-1,5	-2,6	YGL088W	YGL088W	-2,1	-2,1	nd
YGL009C	LEU1	-3	-5,9	-5,9	YER091C	MET6	-2	-2,8	-4,2
YLR303W	MET17	-2,9	-3,8	-3,2	YDR382W	RPP2B	-2	-20,9	-34,4
YKR093W	PTR2	-2,9	nd	-2,1	YKL001C	MET14	-2	-1,6	-5,6
YGR121C	MEP1	-2,8	-1,6	-2,5	YFL021W	GAT1	-2	-2,3	-4,8
YDR481C	PHO8	-2,8	-2,9	-2,5	YFL056C	AAD6	-2	nd	-6,3
YKL120W	OAC1	-2,8	-2,2	-4,5	YHR029C	YHI9	-1,9	nd	-3,6
YLL060C	GTT2	-2,8	nd	-17,6	YJL012C	VTC4	-1,9	nd	-3,8
YOR375C	GDH1	-2,8	-2,3	nd	YPL171C	OYE3	-1,9	-1,5	-13,6
YHR029C	YHI9	-2,6	-1,9	-4,3	YBR157C	ICS2	-1,7	nd	-3,7
YML116W	ATR1	-2,6	-4,8	-4,8	YCL025C	AGP1	-1,7	nd	-2,6
YNL134C	YNL134C	-2,6	-5,1	-5,2	YER067W	YER067W	-1,7	nd	-3,2
YER091C	MET6	-2,5	-3,1	-4,2	YMR173W-A	YMR173W-A	-1,7	-2,3	-2
YML131W	YML131W	-2,5	-3,5	-3,4	YDR533C	HSP31	-1,6	-2,1	-2,9
YOR032C	HMS1	-2,3	-2,4	nd	YMR090W	YMR090W	-1,6	nd	-4,7
Q0160	SCE1	-2,1	no lista	nd	YMR173W	DDR48	-1,6	-2,4	-2,5
YNR034W-A	YNR034W-A	-2	nd	-5,2	YKL103C	LAP4	-1,5	nd	-4,7
YBR093C	PHO5	nd	-4,4	-15,2	YPL274W	SAM3	-1,5	nd	-3,3
YCL030C	HIS4	nd	-2,3	-3,4	YBR093C	PHO5	nd	-2,9	-11,2
YDL124W	YDL124W	nd	-2,7	-3,7	YCL030C	HIS4	nd	-1,6	-3,3
YDL131W	LYS21	nd	-3,3	-2,1	YCR098C	GIT1	nd	-2,6	-10
YDR533C	HSP31	nd	-2,3	-3,5	YDL124W	YDL124W	nd	-2,8	-4,3
YER042W	MXR1	nd	-2,2	-2,6	YDL131W	LYS21	nd	-4,3	-2
YER080W	FMP29	nd	-1,7	-2,9	YDR481C	PHO8	nd	-2,9	-3,9
YER081W	SER3	nd	-1,6	-4,5	YDR516C	EMI2	nd	-2,3	-2,1
YFL057C	AAD16	nd	-2,1	-8,1	YER081W	SER3	nd	-2,8	-5,4
YHR208W	BAT1	nd	-3,4	-3,3	YFL057C	AAD16	nd	-2	-9,5
YIL074C	SER33	nd	-2	-2,5	YFR015C	GSY1	nd	-1,9	-2,7
YIL167W	SDL1	nd	-2,2	-2,9	YGL184C	STR3	nd	-2,3	-5,2
YIL168W	SDL1	nd	-2,2	-2,3	YGR161C	RTS3	nd	-2,4	-2,1
YJL101C	GSH1	nd	-2,4	-2,1	YHR208W	BAT1	nd	-2,3	-2
YJR010W	MET3	nd	-1,7	-4,4	YIR032C	DAL3	nd	-2,1	-5,3
YJR137C	ECM17	nd	-1,9	-3,2	YJL101C	GSH1	nd	-1,7	-3,2
YKL103C	LAP4	nd	-1,4	-4,5	YJR078W	BNA2	nd	-1,5	-4,8
YLR348C	DIC1	nd	-1,6	-3,1	YLR348C	DIC1	nd	-1,6	-3,3
YMR038C	CCS1	nd	-2,2	-2,3	YML116W	ATR1	nd	-2,4	-3,6
YMR090W	YMR090W	nd	-1,5	-5,5	YML142W	MEP2	nd	-3,6	-5
YMR173W	DDR48	nd	-2,1	-2,5	YNL241C	MET19	nd	-1,6	-2,4
YMR173W-A	YMR173W-A	nd	-2	-2,6	YOR032C	HMS1	nd	-2	-1,9
YMR318C	ADH6	nd	-2,5	-2,5	YOR315W	SFG1	nd	-2,1	-2
YOL151W	GRE2	nd	-3,5	-3,4	YOR348C	PUT4	nd	-1,5	-5
YOR348C	PUT4	nd	-2,2	-8,2	YPR194C	OPT2	nd	-2,5	-8,3
YPR167C	MET16	nd	-3	-3,5					
YPR194C	OPT2	nd	-2,6	-6,1					

*no lista: el biochip no presenta muestras para ese gen.

†nd: No diferencial: genes sin expresión diferente entre D4567 y W303.

Estos resultados sugieren que la delección de los genes de las proteínas P, o la ausencia de éstas en el ribosoma, causa alteraciones en la expresión de determinados genes, siendo la respuesta represora la más potente. Se puede observar que existe mayor homogeneidad en los datos correspondientes a represión de la expresión génica

que en los de activación, como demuestra el mayor número de coincidencias entre todas las plataformas. La tendencia de la expresión génica se conserva en las tres plataformas en ambas tablas (con la excepción de *ECM4* en transcripción) siendo más homogénea en los genes que muestran mayores diferencias de expresión y más en los reprimidos que en los activados.

IV.1.4. VALIDACIÓN DE DATOS DE MICROARRAYS.

Para confirmar los valores de expresión génica diferencial obtenidos de los microarrays en las tres plataformas utilizadas y validar los resultados se realizaron experimentos de QRT-PCR. Para ello se escogieron un conjunto de genes representativos que cubriese una serie de requisitos para la confirmación: se ensayaron genes con expresión invariante para validar la expresión génica no diferencial mostrada en los resultados de microarrays y normalizar los datos, (*PHO4*, *MET4* y *ACT1*), genes presentes en todas las plataformas (tanto activados, *NFS1*, como reprimidos, *PHO11* y *MFA α 2*), genes presentes o ausentes exclusivamente en cada una de ellas (*AIF1*, *MET13*, *MET2*, *PHO5*) y algún gen con los valores más dispares entre plataformas (*CTR3*). Se trabajó sólo con RNA total por reproducibilidad y menor manipulación, ya que apenas hay diferencias entre transcripción y traducción.

IV.1.4.1. Validación mediante QRT-PCR.

La normalización de los valores de expresión se realizó utilizando el mRNA de *ACT1*. En la figura 4.7 y en la tabla 4.14 se puede observar que realmente los genes reguladores de la ruta del metabolismo del fosfato, o al menos el ensayado *PHO4*, mantienen una expresión prácticamente neutra (1,1 veces) que incluso permitiría usarlo como gen de referencia para realizar la normalización) a pesar de que la ruta regulada está reprimida en D4567, como se observa en los casos de *PHO5* (5 veces) y *PHO11* (25 veces). En lo que respecta a los genes ensayados de la ruta de biosíntesis de metionina, en D4567 el regulador *MET4* presenta una leve represión (1,2 veces); mientras que los dos genes estructurales parecen estar ligeramente activados en D4567, *MET13* (1,5 veces) y *MET2* (1,4 veces). Sin embargo, estos valores parecen estar en el límite de detección de la técnica empleada. *CTR3*, transportador de alta afinidad a cobre, se confirma como diferencialmente activado en D4567. Según los valores de QRT-PCR se expresa 6 veces más en D4567 que en W303. *NFS1*, cistein desulfurasa implicada en biogénesis de estructuras Fe/S, se expresa 2,3 veces más en D4567. *MFA α 2* codifica la feromona α y se expresa 4 veces más en W303. Un resultado sorprendente es el caso de *AIF1*, presente en todas las plataformas de biochips y que presenta un valor tan alto de expresión diferencial activada en D4567 a causa de los valores casi despreciables obtenidos en las QRT-PCR para la expresión en W303, cercanos al control sin muestra.

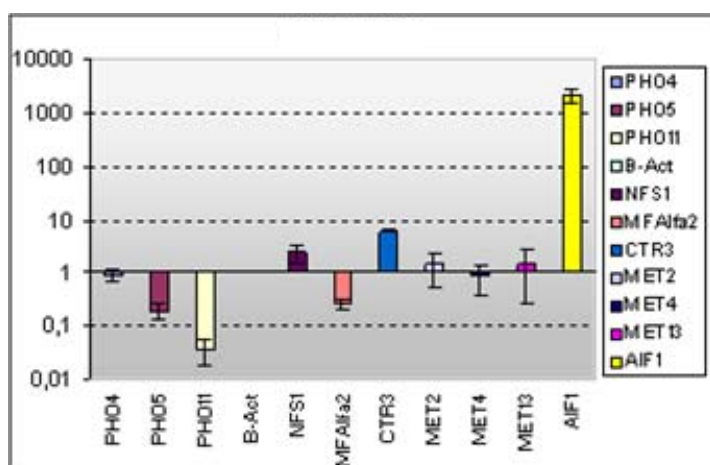


Figura 4.7. QRT-PCR D4567/W303. Representación gráfica de los valores de expresión diferencial en la cepa D4567 respecto a W303, de los genes indicados normalizados con Actina (*ACT1*).

Tabla 4.14. QRT-PCR de D4567/W303. Exp: Diferencias de expresión. Desv: Desviación

Gen	Exp	Desv
<i>PHO4</i>	0.89	0.21
<i>PHO5</i>	0.19	0.06
<i>PHO11</i>	0.04	0.02
<i>ACT1</i>	1.00	0.00
<i>NFS1</i>	2.35	0.85
<i>MFA1a2</i>	0.25	0.05
<i>CTR3</i>	5.92	0.06
<i>MET2</i>	1.42	0.89
<i>MET4</i>	0.85	0.49
<i>MET13</i>	1.49	1.24
<i>AIF1</i>	2142.38	630.00

IV.1.4.2. Validación y comparación de los sistemas empleados.

Los valores de expresión génica diferencial entre las cepas mutante y silvestre que se obtuvieron por QRT-PCR se compararon con los obtenidos en cada una de las plataformas de microarrays empleadas. La figura 4.8 muestra una comparación de estas cuatro técnicas empleadas, y en la tabla 4.15 se recopilan los valores de expresión génica diferencial correspondientes. En estos resultados se puede observar como se conserva la tendencia en la expresión activada o reprimida entre todas las plataformas de biochips y la QRT-PCR. En los dos casos más extremos (*AIF1* y *PHO11*), los valores de expresión relativa obtenidos por QRT-PCR rebasan a los obtenidos en todos los biochips, mientras que en la mayoría se encuentran en escalas comparables. Sin embargo, *CTR3* es un caso especial, pues se seleccionó para los ensayos por ser el gen con mayor diferencia entre plataformas. Los valores relativos obtenidos en la QRT-PCR para este gen son comparables a los de los microarrays de cDNA (Y64K). Los valores de expresión obtenidos a partir de biochips se normalizaron dividiendo entre los obtenidos mediante QRT-PCR para cada uno de los genes ensayados, indicando que la plataforma con valores cuantitativos más similares a la QRT-PCR es la Y64K, como se constata por la mayor proximidad a 1 de la media de los valores normalizados.

Como se observa en la tabla 4.15, los valores procedentes de microarrays con $3 > z \geq 2$ no difieren de los obtenidos por QRT-PCR más de lo que los hacen los que tiene $z > 3$, por lo que se pueden considerar válidos para los cálculos de regulación.

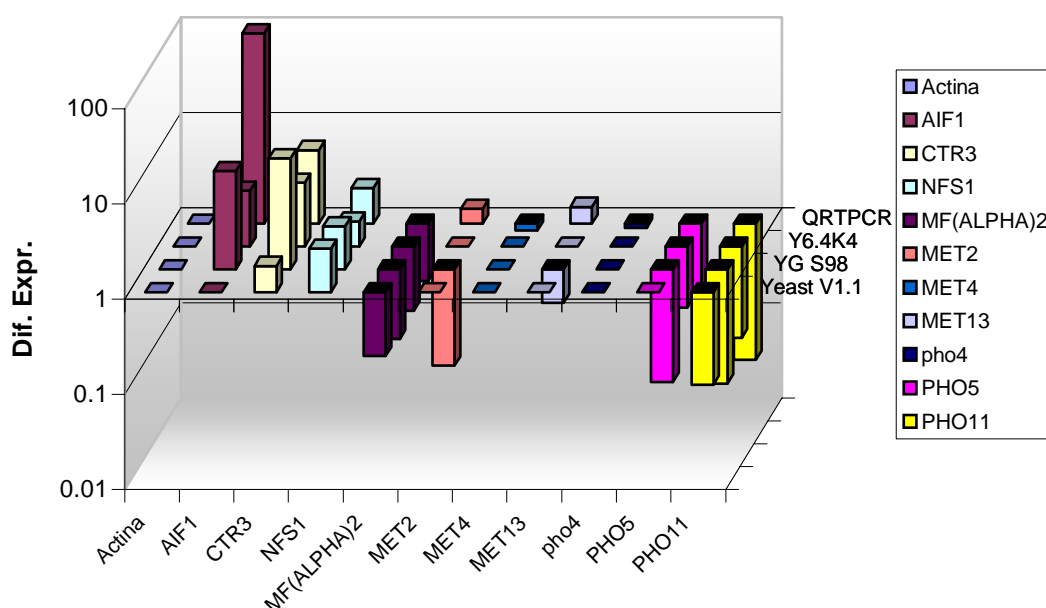


Figura 4.8. Comparación de microarrays y QRT-PCR. En la gráfica se muestran los resultados obtenidos en cada una de las diferentes plataformas de microarrays utilizados: Yeast V1.1 (oligos de 70-mer Yeast GeneList V1.1), YG S98 (oligos de 20-mer de Affymetrix), Y6.4K4 (cDNA, Y6,4K4) y en la QRT-PCR, empleada como sistema de validación de los resultados procedentes de biochips.

Tabla 4.15. Comparación de microarrays y QRT-PCR. Valores de expresión génica obtenidos en cada sistema. YG1.1: oligoarrays Yeast GeneList V1.1. YGS98: biochips de Affymetrix. Y64K: biochips de cDNA Yeast 6,4K4. QRT-PCR: RT-PCR cuantitativa.

	YG1.1		YGS98		Y64K		QRT-PCR	
	Exp†	Norm*	Exp	Norm	Exp	Norm	Exp	Norm
<i>Actina</i>	1,06	1,06	0,92	0,92	0,93	0,93	1	1
<i>AIF1</i>	1,52	0	10,85	0,01	3,87	0	2142,3	1
<i>CTR3</i>	1,9	0,32	14,78	2,5	4,66	0,79	5,92	1
<i>NFS1</i>	2,89	1,23	2,84	1,21	1,83	0,78	2,35	1
<i>MF(ALPHA)2</i>	0,21	0,84	0,19	0,76	0,21	0,84	0,25	1
<i>MET2</i>	0,77	0,54	0,1	0,07	1,23	0,87	1,42	1
<i>MET4</i>	1,03	1,21	1,08	1,27	0,93	1,09	0,85	1
<i>MET13</i>	1,66	1,11	0,44	0,3	0,8	0,54	1,49	1
<i>PHO4</i>	0,78	0,88	1	1,12	0,73	0,82	0,89	1
<i>PHO5</i>	0,43	2,26	0,07	0,37	0,23	1,21	0,19	1
<i>PHO11</i>	0,11	2,75	0,06	1,5	0,11	2,75	0,04	1
<i>media</i>		1,11		0,91		0,97		1

†Expresión: valores de expresión génica D4567/W303.

*Normalizado: referida a los obtenidos en la QRT-PCR, y la media.

Cursiva: valores de expresión asignados tomados de $3 > z \geq 2$.

IV.1.5. mRNAs TRADUCIDOS DIFERENCIALMENTE ENTRE D4567 Y W303.

Una vez que los resultados cuantitativos obtenidos en los experimentos con microarrays fueron validados, se procedió al análisis comparativo del transcriptoma y el traductoma para alcanzar el objetivo inicial de identificar genes regulados

traduccionalmente de manera diferencial entre las cepas W303 y D4567. Para ello se realizó un estudio a partir de los datos de expresión génica diferencial obtenidos en todas las plataformas (tablas 4.12 y 4.13), para contrastar los resultados entre éstas e identificar el conjunto de genes que se muestren regulados de forma diferencial en la traducción. Para ello se consideraron los genes con valores significativos o asignados ($z \geq 2$) en al menos dos plataformas, y se calculó la relación de la expresión diferencial entre traductoma y transcriptoma. En la tabla 4.16 se muestran los genes con regulación diferencial de la expresión génica en traducción entre las cepas D4567 y W303. Los valores numéricos proceden del cociente entre traducción y transcripción en el mismo tipo de plataforma. En los casos en los que existían valores perdidos, se consideró que éstos adoptaban el valor más alto posible dentro del rango de los valores correspondientes a expresión diferencial: 2 para activación y -2 (ó 0,5) para represión. La existencia de genes regulados en YG1.1 presentes en la tabla 4.9 pero ausentes en la tabla 4.16, y viceversa, se debe al criterio de selección empleado en el análisis de los resultados del conjunto de las plataformas empleadas, donde se descartan genes que sólo se recogen en una de ellas (p.e. cualquier gen regulado en YG1.1 que no se regule en las otras dos) y se aceptan genes presentes en dos plataformas (p.e. genes que no estén en YG1.1 pero sí en YGS98 e Y64K).

Tabla 4.16. Regulación diferencial traduccional de D4567/W303.
Rojo: Regulación positiva en la traducción del mutante D4567. Verde: Regulación positiva de la traducción en la cepa silvestre W303. ORFs/Verde: expresión génica reprimida en D4567. ORFs/Rojo: expresión génica activada en D4567. YG1.1: oligoarrays Yeast GeneList V1.1. Y64K: biochips de cDNA Yeast 6,4K4. YGS98: biochips de Affymetrix.

ORF	Gen	YG1.1	Y64K	YGS98	Promedio
YPL056C	unknown	>6,5	nd	1,0	3,8
YHR215W	PHO12	3,9	1,9	no lista	2,9
YPR183W	DPM1	4,7	1,0	nd	2,9
YCR098C	GIT1	>2,8	2,6	3,0	2,8
YDR382W	RPP2B	4,1	1,2	2,1	2,4
YML123C	PHO84	2,1	4,4	0,7	2,4
YAR071W	PHO11	2,7	2,3	1,9	2,3
YMR006C	PLB2	>2,1	1,0	>2,8	2,0
YKR039W	GAP1	2,4	nd	1,5	2,0
YNL142W	MEP2	>3,5	1,2	1,2	1,9
YDL130W	RPP1B	2,5	0,9	2,2	1,9
YDR281C	PHM6	3,4	1,0	0,7	1,7
YGL255W	ZRT1	>2	nd	>1,2	1,6
YHR208W	BAT1	nd	1,5	1,7	1,6
YLL061W	MMP1	>1,7	>1,2	nd	1,5
YPL019C	VTC3	1,5	1,8	1,1	1,5
YML116W	ATR1	>1,3	2,0	1,3	1,5
YGL009C	LEU1	1,0	2,2	1,2	1,5
YOR348C	PUT4	nd	1,5	1,6	1,5
YFL021W	GAT1	2,3	0,8	1,0	1,4
YHR136C	SPL2	1,6	1,7	0,8	1,4
YPL171C	OYE3	1,9	1,5	0,8	1,4
YJL012C	VTC4	1,8	>1,2	1,0	1,4
YER072W	VTC1	1,5	1,1	1,5	1,4
YOL039W	RPP2A	1,2	0,9	2,1	1,4
YBR093C	PHO5	nd	1,5	1,3	1,4

YNL036W	NCE103	0,7	2,1	nd	1,4
YCL017C	NFS1	0,6	1,5	2,2	1,4
YJR079W	YJR079W	<0,3	nd	1,1	0,7
YDR089W	YDR089W	<0,4	1,0	nd	0,7
YCL064C	CHA1	0,7	<0,8	nd	0,7
YCL021W-A	YCL021W-A	0,6	1,0	nd	0,6
YER081W	SER3	nd	0,2	0,8	0,5
Q0275	COX3	<0,6	no lista	0,4	0,5
Q0070	A15_ALPHA	0,1	no lista	<0,4	0,2

*no lista: el biochip no presenta muestras para ese gen.

†nd: No diferencial: genes sin regulación diferencial D4567/W303.

La inmensa mayoría de genes regulados positivamente (genes con un cociente traductoma/transcriptoma $\geq 1,4$) en D4567 están reprimidos tanto en transcripción como en traducción, lo que puede deberse a una respuesta celular para intentar restaurar los niveles de expresión global de estos genes, observándose de forma consistente la regulación diferencial de la traducción entre todas las plataformas. Entre los genes regulados positivamente en traducción de forma diferencial en D4567 se observa la presencia de (i) los pertenecientes al regulón de fosfato: *PHO5*, *PHO11*, *PHO12* (las tres fosfatasa ácidas regulables por represión), *VTC1*, *VTC3*, *VTC4* (implicados en la acumulación de fosfato), *GIT1* (permeasa regulada por fosfato), *PHO84* (transportador de alta afinidad a fosfato que además confiere sensibilidad a arsenato), *PHM6*, (transportador de fosfato) y *SPL2* (regulador de fosfolipasa), (ii) genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos como *PLB2* (fosfolipasa B) y *OYE3* (reductasa del metabolismo de esteroides), y (iii) genes implicados en transporte: *GAP1* (permeasas generales de aminoácidos), *OPT2* (transportador de péptidos), *BAT1* (transportador mitocondrial de aminoácidos ramificados, expresado en fase logarítmica de crecimiento y reprimido en fase estacionaria), *ZRT1* (transportador de zinc de alta afinidad), *ATR1* (bomba de extrusión multidroga necesaria para la resistencia a aminotriazol), *GAT1* (activador transcripcional de genes implicados en procesos de represión por catabolito de nitrógeno), *MEP2* (transportador de alta afinidad de amonio), *PUT4* (transportador de prolina implicado en el transporte de amonio) y *MMP1* (permeasa de alta afinidad a S-metilmetionina, necesaria para el empleo de ésta como fuente de azufre, similar a *SAM3*).

Los genes regulados negativamente en D4567 (genes con un cociente traductoma/transcriptoma $\leq 0,7$, correspondiente a una represión de 1,4 veces), en su mayoría activados en transcripción y/o traducción con valores relativamente bajos de expresión son *CHA1* (catabolismo de serina y treonina), *YCL021W-A* (sin caracterizar), *COX3* (subunidad III de la citocromo C oxidasa), *A15_Alfa* (endonucleasa I-SceIV, implicada en movilidad de intrones). Esta regulación traduccional negativa en la mayoría de genes activados también puede deberse a una respuesta celular para intentar restaurar los niveles de expresión global de estos genes.

Cabe destacar un pequeño grupo de genes cuya regulación muestra potenciación (126)

positiva (homodireccional) entre transcripción y traducción, tanto en activación: *NFS1* (biogénesis de proteínas Fe/S y tiomodificación de tRNAs) y *NCE103* (anhidrasa carbónica implicada en respuesta a estrés oxidativo y exportación no convencional de proteínas), como en represión: *YJR079W* (función desconocida cuya mutación desacopla la función respiratoria) *YDR089W* (función desconocida, cuya delección confiere resistencia a níquel), *SER3* (primer paso de la ruta de biosíntesis de serina y glicina). La regulación traduccional de estos genes se aparta de la que se esperaría debida a una respuesta celular encaminada a restaurar la expresión global.

IV.1.5.1. Estudio de patrones estructurales en el mRNA de genes regulados.

Siguiendo el modelo de regulación propuesto se hizo una búsqueda de patrones de estructuras primarias y secundarias presentes en los mensajeros de los genes relacionados en el apartado anterior (tabla 4.16), que pudiera apoyar la existencia de una selección de mensajeros por parte de los ribosomas sin proteínas ácidas en el tallo.

El alineamiento múltiple de las regiones 5'UTR, ORF y 3'UTR de los genes con una respuesta diferencial entre D4567 y W303 no presentó una secuencia consenso que pudiera considerarse concluyente.

La búsqueda de plegamientos en la molécula de mRNA que pudiesen originar motivos estructurales, posible base del reconocimiento diferencial por parte de ribosomas sin proteínas ácidas, se ha realizado empleando la herramienta informática *mFold* (209). Se tomaron diferentes longitudes de secuencias de los genes de la lista con diferencias de expresión más acentuada y de genes que no variaban, como control negativo de patrones que no explicarían una mayor afinidad del tallo ribosómico de las cepas mutantes. Se probaron secuencias de diferentes longitudes de regiones 5'UTR, de las ORFs, de la región 3'UTR, y de todas ellas combinadas: 150 nucleótidos al 5' del AUG de inicio, solo 50 nucleótidos, 150 nucleótidos del 5'UTR y 50 de la ORF, la ORF completa y los 100 nucleótidos flanqueantes de ambas regiones UTRs, así como de los 100, 150 y 200 nucleótidos de la región 3'UTR. No se encontró ningún patrón común a todos o algunos de los mensajeros empleados. Posteriormente estas secuencias se cotejaron con el catálogo de secuencias de mRNA con estabilidad conocida recogido en (162), sin que se encontrase un patrón de plegamiento.

IV.1.6. EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LOS DOBLES MUTANTES.

Las proteínas ácidas se unen a P0 como dos estructuras heterodiméricas de P1 y P2, para constituir el tallo ribosómico, adoptando la configuración $P1\alpha/P2\beta$ y $P1\beta/P2\alpha$ en la cepa silvestre: parejas canónicas que muestran una mayor afinidad e interaccionan preferentemente. Una vez identificados los genes que parecen mostrar una regulación diferencial de la traducción en el mutante D4567 sin proteínas ácidas, se procedió a

estudiar la posible regulación diferencial que mostraban estos mismos genes en mutantes que expresan únicamente una de éstas parejas canónicas de proteínas ácidas: D46 (cepa con el heterodímero $P1\alpha/P2\beta$) y D57 (cepa con el heterodímero $P1\beta/P2\alpha$). Para ello se hicieron experimentos de hibridación en microarrays de transcriptoma y traductoma comparando la expresión diferencial de estas cepas frente a W303. Se hibridaron 16 oligoarrays YG1.1, 4 para cada condición (transcriptoma D46/W303, traductoma D46/W303, transcriptoma D57/W303 y traductoma D57/W303). Se seleccionaron 3 de cada una, mediante los procedimientos ya mencionados en el análisis de oligoarrays con las cepas D4567 y W303, para realizar el mismo tipo de análisis en la Unidad de Bioinformática, tomando como significativos genes con $z \geq 3$ y cambios de expresión superiores a 2 veces y asignando valores sólo si $z \geq 2$. Los resultados finales de expresión diferencial en transcriptoma se muestran en la tabla 4.17. El listado completo de genes con expresión diferencial tanto en transcriptoma como en traductoma ($z \geq 2$) se presenta en las tablas de apéndice A.7 a A.10. En las hibridaciones en microarrays D46/W303 y D57/W303 se encontró un menor número de genes con alteraciones en su expresión en comparación a las hibridaciones D4567/W303: 33 en transcriptoma de D46 (19 activados y 14 reprimidos), 44 en traductoma de D46 (26 activados y 18 reprimidos), 47 en transcriptoma de D57 (21 activados y 26 reprimidos) y 37 en traductoma de (18 activados y 19 reprimidos).

Según se observa en la tabla 4.17, en general, se puede constatar que los dobles mutantes se asemejan a W303 puesto que los genes cuya expresión se altera en D4567 no lo hacen en los mutantes D46 y D57. Sin embargo, se encuentran excepciones, con un pequeño número de genes que alteran su expresión si falta el heterodímero $P1\beta/P2\alpha$ (genes con expresión diferencial en D4567 y D46, como *HSP12*, *GCV1*, *PIR3*, *YLR281C*, *ATP8*, *ATP6*, *FLR1*, *MET17*, *GTT2*, *PLB2*), el $P1\alpha/P2\beta$ (genes con expresión diferencial en D4567 y D57, como *BI2*, *PHO11*, *LEU1*, *PHO12*, *VTC4*, *PHO84*, *PTR2*), o cualquiera de ellos (genes con expresión diferencial en todos los mutantes, en los que falta al menos uno de los heterodímeros, *AI5_Alfa*, *YCL021W-A*, *HIS3*, *PHM8*).

Tabla 4.17. Expresión diferencial en dobles mutantes. Comparación de la expresión diferencial en los mutantes D46, D57 y D4567 con respecto a W303. Rojo: Activación de la expresión en el mutante, Verde: Represión de la expresión en el mutante.

Activados			Reprimidos		
ORF	Gen	D4567 D46 D57	ORF	Gen	D4567 D46 D57
Q0070	AI5_ALPHA	38.7 11.3 90.5	YDL081C	RPP1A	-16.8 nd -24.3
YFL014W	HSP12	5.1 4.9 nd	YOL039W	RPP2A	-16.6 -12.1 nd
YCL021W-A	YCL021W-A	5.0 3.2 2.1	YML123C	PHO84	-9.7 nd -3.0
YER053C-A	YER053C-A	4.5 nd nd	YAR071W	PHO11	-9.4 nd -7.0
Q0110	BI2	3.8 nd 11.3	YHR215W	PHO12	-8.7 nd -3.2
YLR327C	TMA10	3.3 nd nd	YDR382W	RPP2B	-8.4 1.9 -12.1
YCL064C	CHA1	3.1 6.1 4.3	YNL130C	RPP1B	-8.0 -9.2 -3.5
YLR247C	IRC20	3.0 nd nd	YKR039W	GAP1	-7.8 nd nd
YCL017C	NFS1	2.9 nd nd	YOR103C	OST2	-7.0 nd nd
YLR278C	YLR278C	2.8 nd nd	YNL142W	MEP2	-6.9 nd nd

YLR263W	RED1	2.8	nd	nd	YDL130W	RPP1B	-6.6	-5.7	nd
YMR095C	SNO1	2.8	nd	nd	YMR292W	GOT1	-6.2	nd	-3.2
YLR262C-A	TMA7	2.7	nd	nd	YHR136C	SPL2	-6.1	nd	nd
YDR019C	GCV1	2.7	1.9	nd	YCR098C	GIT1	-5.8	nd	nd
YIR039C	YPS6	2.6	nd	nd	YLR083C	EMP70	-5.7	nd	nd
YLR259C	HSP60	2.6	nd	nd	Q0105	COB	-5.1	-2.3	nd
YLR309C	IMH1	2.5	nd	nd	YNL268W	LYP1	-4.9	nd	-6.1
YLR258W	GSY2	2.5	nd	nd	YGL161C	YIP5	-4.7	nd	nd
YLR240W	VPS34	2.5	nd	nd	YGL089C	MF(ALPHA)2	-4.7	-13.9	nd
YLR310C	CDC25	2.5	nd	nd	YFL021W	GAT1	-4.7	nd	nd
YLR304C	ACO1	2.5	nd	nd	Q0080	ATP8	-4.7	-36.8	nd
YKL163W	PIR3	2.4	2.6	nd	YPL019C	VTC3	-4.3	nd	-9.8
YLR287C-A	RPS30A	2.4	nd	nd	YMR006C	PLB2	-4.2	-2.5	nd
YLR294C	YLR294C	2.4	nd	nd	YNL327W	EGT2	-4.2	nd	nd
YER053C	PIC2	2.3	nd	nd	YJL212C	OPT1	-4.0	nd	nd
YGR142W	BTN2	2.3	nd	nd	YGL255W	ZRT1	-3.9	nd	nd
YEL039C	CYC7	2.3	nd	nd	Q0085	ATP6	-3.7	-119.4	nd
YLR228C	ECM22	2.2	nd	nd	YER037W	PHM8	-3.5	2.0	-3.0
YKL026C	GPX1	2.2	nd	nd	YPL274W	SAM3	-3.4	-3.7	nd
YGL262W	YPT6	2.2	nd	nd	YJL012C	VTC4	-3.4	nd	-4.9
YLR281C	YLR281C	2.1	2.8	nd	YER072W	VTC1	-3.3	nd	nd
YOR202W	HIS3	1.9	2.5	4.0	YJR001W	AVT1	-3.3	nd	nd
					YNL038W	GPI15	-3.2	nd	nd
					YFL056C	AAD6	-3.2	nd	nd
					YMR215W	GAS3	-3.2	nd	nd
					YBR008C	FLR1	-3.2	-3.2	nd
					YER056C	FCY2	-3.2	nd	nd
					YMR149W	SWP1	-3.1	nd	nd
					YFL004W	VTC2	-3.1	nd	nd
					YKL001C	MET14	-3.1	nd	nd
					YCL025C	AGP1	-3.0	nd	nd
					YMR307W	GAS1	-3.0	nd	nd
					YGL009C	LEU1	-3.0	nd	-3.7
					YNL070W	TOM7	-3.0	-3.0	nd
					YNL156C	NSG2	-3.0	nd	-5.3
					YLR303W	MET17	-2.9	-3.5	nd
					YER060W-A	FCY22	-2.9	nd	nd
					YJL012C-A	YJL012C	-2.9	nd	-3.2
					YCR034W	FEN1	-2.9	nd	nd
					YKR093W	PTR2	-2.9	nd	-4.3
					YGR121C	MEP1	-2.8	nd	nd
					YDR481C	PHO8	-2.8	nd	nd
					YKL120W	OAC1	-2.8	nd	nd
					YLL060C	GTT2	-2.8	-3.2	nd
					YNL259C	ATX1	-2.8	nd	nd
					YOR375C	GDH1	-2.8	nd	nd
					YAL023C	PMT2	-2.5	nd	nd
					YAR042W	SWH1	-2.5	nd	nd
					YDL155W	CLB3	-2.5	nd	nd
					YER091C	MET6	-2.5	nd	nd
					YML131W	YML131W	-2.5	nd	nd
					YNL134C	YNL134C	-2.5	-3.7	nd
					YPR110C	RPC40	-2.3	nd	nd
					YDR367W	YDR367W	-2.1	nd	nd
					YDR343C	HXT6	-2.0	nd	nd
					YNR034W-A	YNR034W-A	-2.0	nd	nd

*nd: No diferencial: genes sin expresión diferente entre mutante y W303.

A partir de los datos de transcriptoma y traductoma obtenidos para D46 y D57 se procedió a la identificación de mRNAs traducidos de forma diferencial con respecto a W303, de forma análoga al caso de D4567/W303. La comparación de los genes regulados diferencialmente en cada uno de estos mutantes con los identificados en

D4567/W303 se muestra en la tabla 4.18. A la vista de estos resultados, se podrían establecer tres tipos de regulación traduccional diferencial según la composición del tallo ribosómico. De esta forma, se observa un conjunto mayoritario de genes para los cuales es necesaria la ausencia en el tallo ribosómico de ambos heterodímeros de proteínas ácidas para que se establezca una regulación diferencial, un grupo más pequeño de genes regulados de forma diferente según el heterodímero ausente, y un tercer grupo minoritario de genes regulados de igual manera en todos los mutantes, lo que indica que es necesaria la ausencia indistinta de un heterodímero para que sean regulados. En algunos de los casos en los que existe regulación simultánea en dos o más mutantes, se pueden encontrar divergencias en dicha regulación, que ocurre en distinto sentido.

Tabla 4.18. Comparación de la regulación diferencial en mutantes.
Regulación traduccional diferencial en los mutantes D4567, D46 y D57 con respecto a W303. *Rojo*: Regulación positiva en el mutante, *Verde*: Regulación negativa en el mutante.

ORF	Gen	D4567	D46	D57
YPL056C	unknown	3.8	1.2	0.7
YHR215W	PHO12	2.9	0.9	>1,6
YPR183W	DPM1	2.9	nd†	>4,6
YCR098C	GIT1	2.8	nd	nd
YML123C	PHO84	2.4	nd	<0,7
YAR071W	PHO11	2.3	<0,9	1
YMR006C	PLB2	2	1.1	nd
YKR039W	GAP1	2	nd	nd
YNL142W	MEP2	1.9	nd	nd
YDR281C	PHM6	1.7	nd	nd
YGL255W	ZRT1	>1,6	nd	nd
YHR208W	BAT1	1.6	nd	nd
YOR348C	PUT4	1.5	1.2	nd
YML116W	ATR1	1.5	1.1	nd
YLL061W	MMP1	1.5	nd	nd
YER067W	YER067W	1.5	<0,9	nd
YGL009C	LEU1	1.5	nd	1.3
YPL019C	VTC3	1.5	nd	>4,9
YCL017C	NFS1	1.4	nd	>2,2
YPL171C	OYE3	1.4	nd	nd
YJL012C	VTC4	1.4	nd	1.6
YBR093C	PHO5	1.4	nd	nd
YER072W	VTC1	1.4	nd	0.6
YHR136C	SPL2	1.4	nd	nd
YNL036W	NCE103	1.4	nd	nd
YFL021W	GAT1	1.4	nd	0.4
YJR079W	YJR079W	0.7	nd	<0,03
YDR089W	YDR089W	0.7	<0,3	<0,06
YCL064C	CHA1	0.7	0.8	2.5
YCL021W-A	YCL021W-A	0.6	1.9	2.2
Q0275	COX3	0.5	nd	nd
YER081W	SER3	0.5	1.7	1.1
Q0070	AI5_ALPHA	0.2	0.2	0.02

† nd: No diferencial: genes sin regulación diferencial en mutante/W303.

IV.1.7. METABOLISMO DEL FOSFATO.

En los resultados de los experimentos con microarrays y RTPCR cuantitativa se ha constatado una clara represión del regulón del metabolismo del fosfato en la cepa D4567, que no expresa proteínas ácidas, en todas las plataformas empleadas. El mRNA empleado provenía de cepas W303 y D4567 cultivadas en medio rico YPD, con una concentración de fosfato no limitante para el crecimiento, y puesto que estos genes se sobreexpresan en el silvestre sólo al crecer en un medio con baja concentración de fosfato, se realizaron ensayos para determinar si el mutante D4567 mostraba algún defecto en el crecimiento en condiciones de escasez de fosfato, donde se induce todo el regulón. Para ello, W303 y D4567 se inocularon en medio SC sin fosfato suplementado con los requerimientos de cada cepa y con diversas concentraciones de fosfato, realizándose curvas de crecimiento para calcular el tiempo de doblaje y la densidad final del cultivo (ver figura 4.9).

Según los datos de tiempos de generación calculados, la cepa D4567 parece no responder a las diferencias en la concentración de fosfato en el medio de crecimiento mediante variaciones en su velocidad de crecimiento, mientras que W303 aumenta su tiempo de doblaje, alcanzando un 30% más en ausencia de fosfato. Sin embargo, la densidad óptica final de cultivo que alcanza D4567 parece más afectada por la concentración de fosfato, alcanzando en ausencia de fosfato sólo el 50% de la masa celular alcanzada a 6 mM, y aumentando la proporción de forma directa con la concentración de metabolito.

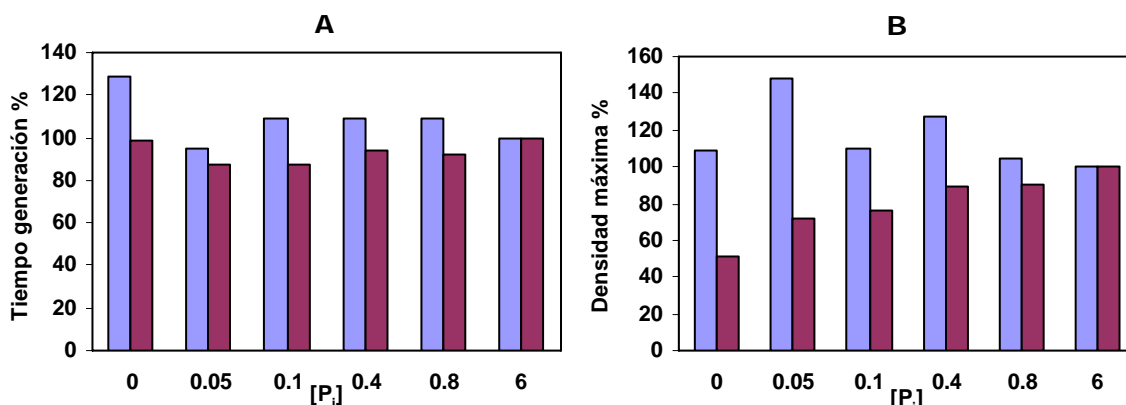


Figura 4.9. Crecimiento a diferentes concentraciones de fosfato. Se muestran el tiempo de generación (A) y la densidad final del cultivo que alcanzan (B) las cepas W303 (azul) y D4567 (rojo) creciendo a diferentes concentraciones de fosfato. Los porcentajes hacen referencia al crecimiento a 6 mM de fosfato de cada cepa.

IV.1.8. ESTUDIOS MITOCONDRIALES.

Los resultados de microarrays han mostrado alteraciones en genes relacionados con las mitocondrias, ya sea tanto por el genoma en el que éstos se encuentran, como por la localización o función de las proteínas codificadas. Por ello se decidió estudiar posibles

alteraciones mitocondriales en el mutante sin proteínas ácidas en el tallo ribosómico.

IV.1.8.1. Morfología y distribución de mitocondrias.

Se realizaron estudios para determinar alguna afectación en el número, estructura o distribución de las mitocondrias del mutante D4567. Para ello se tomaron imágenes por microscopia de fluorescencia de estas cepas transformadas con el plásmido pYX142-mtGFP, que codifica una proteína verde fluorescente (GFP) con la secuencia de importación a mitocondria, de manera que es transportada al lumen mitocondrial. En la figura 4.10 se observa que el patrón de localización mitocondrial presenta varios filamentos continuos dispersos por toda la célula en W303, que aumentan cuando la levadura se cultiva en medio con fuente de carbono no fermentable. Por el contrario, la cepa mutante D4567KR muestra filamentos más cortos, que en ocasiones son estructuras punteadas y no trazos continuos, independientemente de que sea cultivada en medios fermentables o no fermentables, lo que señala una disminución en el número de mitocondrias y/o alteraciones en su unión a citoesqueleto.

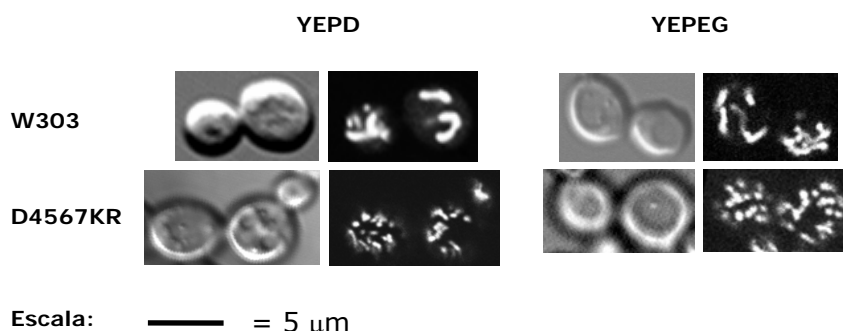


Figura 4.10. Mitocondrias fluorescentes. Imágenes de microscopia de fluorescencia de cepas transformadas con pYX142mtGFP (tabla 2.3).

IV.1.8.2. Expresión de las proteínas mitocondriales identificadas.

Se intentó una aproximación para validar los resultados de microarrays y QRTPCR analizando el nivel de algunas proteínas mitocondriales de las que pudimos obtener anticuerpos específicos. Se analizaron estas proteínas por Western-blot a partir de extractos S30 obtenidos de las cepas W303 y D4567 cultivadas en glucosa o glicerol-etanol con anticuerpos frente a Hsp60p, Aco1p y Nfs1p (figura 4.11). La cuantificación de la cantidad de proteínas presente se realizó mediante densitometría de las bandas mostradas. Los valores obtenidos se recogen en la tabla 4.19.

Las variaciones en la expresión de estas proteínas entre D4567 y W303 cuando se cultivan en medio YPD son del mismo orden que las observadas en microarrays para los genes correspondientes, por lo que tales variaciones parecen confirmarse. Se pueden observar diferencias entre W303 y D4567 en la expresión de estas proteínas tanto en medio YPD como en medio YEPGE, consistentes en un ligero aumento de los niveles en el

mutante. Los niveles de proteína en D4567 en YPD son comparables a los de W303 en YEPGE, exceptuando a Nfs1p, que es algo más bajo. También se produce un incremento de estas proteínas al crecer en medio no fermentable YEPGE, como se observa en la misma tabla al comparar las columnas W303 YEPEG y D4567 YEPEG, si bien este aumento es menor que el encontrado en W303, como se observa al comparar las columnas W303 YEPGE (normalizada con W303 YPD) y D4567 YEPEG/YPD (donde se normalizan los valores de D4567 YEPEG con respecto a los de D4567 YPD).

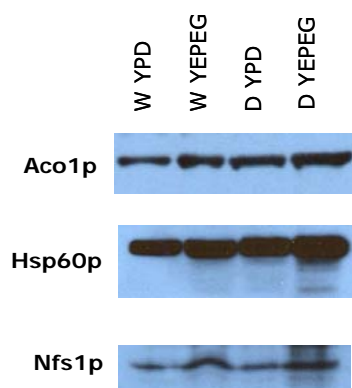


Figura 4.11. Western-blot de fracciones celulares S30 de W303 (W) y D4567 (D) cultivadas en medio respirable (YEPEG) o fermentable (YPD) empleando anticuerpos frente a Aco1p, Hsp60p y Nfs1p.

Tabla 4.19. Densitometrías. Para cada cepa cultivada en el medio indicado, se presentan los valores obtenidos para las proteínas mostradas, mediante densitometrías de películas de Western-blot, tomando como referencia la cantidad de cada proteína expresada en W303 cultivado en YPD. La última columna muestra la cantidad de proteína en D4567 cultivado en YEPGE en relación a YPD.

	W303 YPD	W303 YEPGE	D4567 YPD	D4567 YEPGE	D YEPGE/YPD
Aco1p	1±0	1,49±0,24	1,48±0,26	1,97±0,45	1,33
Hsp60p	1±0	1,27±0,13	1,27±0,08	2,03±0,52	1,60
Nfs1p	1±0	1,53±0,02	1,15±0,16	2,38±0,52	2,07

IV.1.8.3. Perfiles de polisomas de cepas *gran* y *petite* de W303 y D4567.

Puesto que parece haber una alteración en las mitocondrias de D4567, se obtuvieron mutantes *petite* de esta cepa y de W303, por crecimiento en presencia de bromuro de etidio. Se procedió a la obtención de perfiles de polisomas a partir de cepas *gran* y *petite* de W303 y D4567 cultivadas en medios con fuente de carbono fermentable (YPD) o respirable (YEPGE) para buscar posibles defectos en la maquinaria traduccional de la célula debidos a alteraciones en la función mitocondrial (figura 4.12).

La carga de ribosomas que forman parte de polisomas es similar en levaduras *petite* y *gran* cultivadas en medio fermentable en W303 y en D4567. En cambio, esta carga disminuye en cultivos en YEPGE especialmente en D4567. Sin embargo, se pueden apreciar características específicas entre los perfiles de polisomas de W303 y D4567, que

pueden deberse a diferencias en su maquinaria de traducción. El mutante muestra de forma consistente un menor número de ribosomas identificables (picos) formando parte de estructuras polisómicas. Estas estructuras presentan picos máximos diferentes, correspondiente a 4 ribosomas en W303 y 3 en D4567, salvo en cultivos en medio YEPEG donde coinciden en 3 ribosomas. En el mutante se observa un leve incremento en la cantidad de subunidades y ribosomas 80S que no forman parte de los polisomas en comparación con W303. De estos resultados se puede concluir que W303 y D4567 muestran patrones de polisomas diferentes, pero que las variaciones en estos patrones como respuesta a las diferentes condiciones experimentadas es semejante, y que por tanto, de existir una relación entre la función mitocondrial y el perfil de polisomas, es similar en W303 y D4567, sin que ésta se vea modulada por la ausencia/presencia de proteínas ácidas.

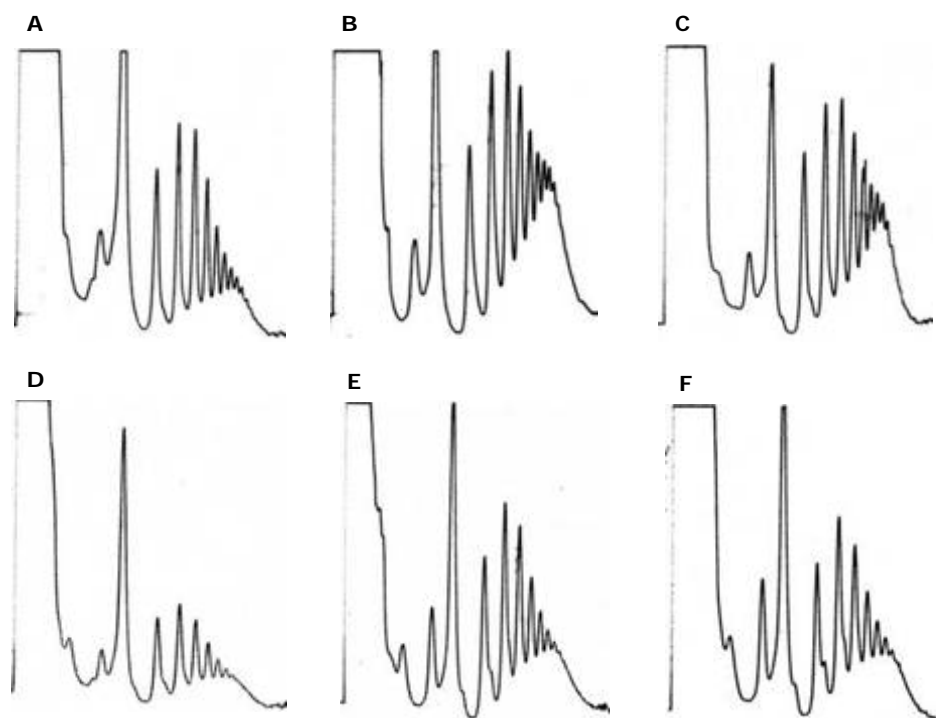


Figura 4.12. Perfiles de polisomas en gradiente continuo de sacarosa del 10% al 50% de cepas W303 en YEPEG (A), W303 *gran* (B) y *petite* (C) cultivadas en medio YPD, D4567 en YEPEG (D), D4567 *gran* (E) y *petite* (F) en YPD.

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE PERFILES DE POLISOMAS.

A raíz de las características observadas en los perfiles de polisomas preparados para la obtención de mRNA asociado (figura 4.1) y los resultados anteriores (figura 4.12), se planteó un estudio sistemático de perfiles de polisomas de la colección de todos los mutantes en el tallo ribosómico, para buscar posibles efectos de la composición de éste sobre la maquinaria traduccional de la célula.

Se han descrito defectos en la traducción en mutantes en proteínas ácidas de tallo a

partir de la observación de alteraciones en la elongación de la síntesis de polifenilalanina (poli- ϕ) en experimentos *in vitro* y en la traducción de mensajeros naturales en extractos libre de células (138). Estas alteraciones podrían deberse a efectos sobre la maquinaria de traducción a causa de las diversas composiciones que puede adoptar el tallo del ribosoma. Para confirmar defectos en la traducción relacionados con la composición del tallo, se hicieron experimentos de centrifugación de extractos celulares a través de gradientes continuos de sacarosa para analizar la distribución de ribosomas en los polisomas de todas las cepas con disrupciones en los genes de proteínas ácidas. Estos perfiles de polisomas aportan información sobre la abundancia de cada pico, (correspondientes a diferentes estructuras polisómicas), el número de ribosomas asociados a un RNA mensajero (*ocupación ribosómica*) y posibles defectos en la iniciación de la traducción (*halfmeros*) o en la elongación. Se experimentó con todas las cepas mutantes en el tallo ribosómico, empleando como control W303, cepa silvestre que expresa todas las proteínas ácidas. En las cepas mutantes simples (D4, D5, D6, D7) se puede observar cualquier variación debida exclusivamente a la ausencia en el tallo de cada una de las proteínas ácidas, lo que servirá de punto de partida para las demás mutaciones. Los mutantes dobles se ensayaron por las posibles combinaciones que ofrecen: tallos que presentan solo una pareja de proteínas ácidas con interacciones preferentes (D46 y D57), no preferentes (D47 y D56) y cuádruples fenotípicos que no tienen ninguna (D45 y D67), aunque ésta última contiene proteínas P2 en su citoplasma. En los mutantes triples (D456, D457, D467 y D567), sin proteínas ácidas en el tallo, se pueden observar las variaciones debidas a la expresión de cada una de las proteínas P.

IV.2.1. GRADIENTES CONTINUOS DE SACAROSA.

Se realizaron experimentos para estudiar los perfiles de polisomas en gradientes continuos de sacarosa con porcentajes del 10% al 50% de las cuatro cepas mutantes defectivas en una única proteína ácida (mutantes simples), y en todas las posibles combinaciones (dobles, triples y cuádruple). La distribución de las diferentes estructuras ribosómicas en la traducción de estas cepas (figura 4.13), permite observar determinadas características de los perfiles de polisomas que reflejan el estado traduccional de las cepas. En la cepa W303 se aprecian un mayor número de picos (hasta 10) que en el resto de mutantes (7 u 8), así como el pico de mayor amplitud correspondiente a estructuras polisómicas con 4 ribosomas, mientras que la mayoría de mutantes dobles, triples y el cuádruple corresponde a 3 y en el caso de mutantes simples el segundo y tercer pico parecen ser igual de prominentes. La presencia de estructuras de tipo *halfmero* es bastante heterogénea entre las diferentes cepas de levadura, siendo las más afectadas las mutantes con un tallo ribosómico que presenta únicamente una pareja de proteínas ácidas, sobre todo las parejas no canónicas, mientras que los

mutantes que no unen proteínas P y los simples presentan *halfmeros* en menor grado.

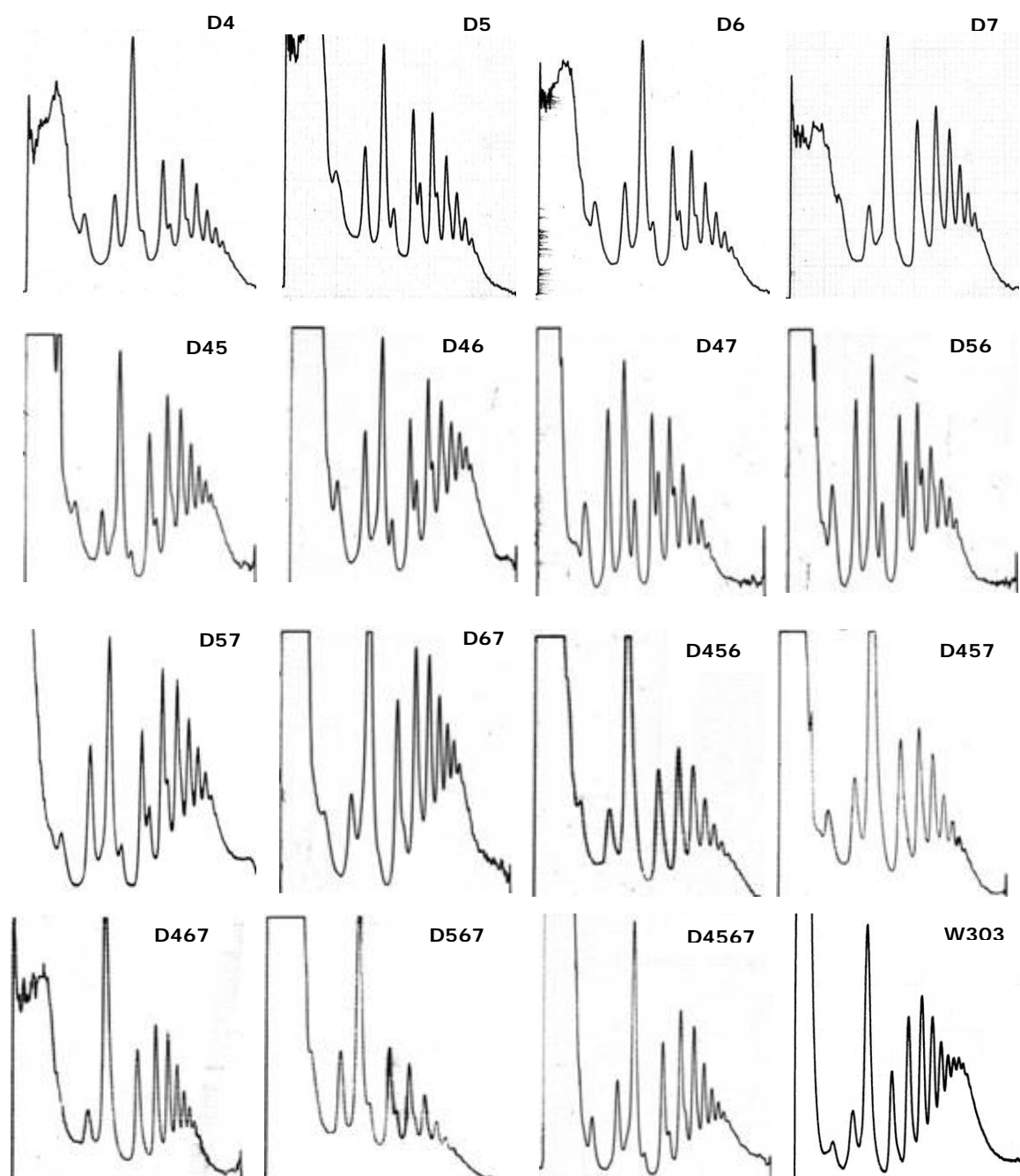


Figura 4.13. Perfiles de polirribosomas en gradiente continuo de sacarosa del 10% al 50% de todas las cepas mutantes en proteínas ácidas.

En la tabla 4.20 se muestran los valores de la cuantificación de los picos empleando el programa *Image J*. Según los gráficos y los valores de la tabla se pueden establecer asociaciones claras, en base a valores comparables en la relación 80S/60S: W303, cepa silvestre con todas las proteínas ácidas interaccionando con P0 en el tallo que tiene una relación de 3,7; D46, D47, D56 y D57, los dobles mutantes con un único tipo de heterodímeros en su tallo ribosómico (1,52); mutantes simples excepto D7 (sin proteína

P1 α) con proteínas en el tallo (2,29); D45, D67 y D4567, mutantes sin proteínas en el tallo, que se comportan de forma similar a W303. Estos resultados sugieren un aumento de estructuras 80S ensambladas en cepas donde las proteínas P están ausentes y defectos en el ensamblaje si solo expresan un tipo de heterodímeros.

Igualmente se pueden constatar diferencias en el reparto de la densidad ribosómica, entre la formación de monosomas o estructuras polirribosómicas, que pueden ser reflejo de una variación en la ocupación ribosómica (*ribosomal occupancy*) de los mensajeros (13) a consecuencia de los defectos descritos anteriormente. La relación polisomas/80S es un buen indicativo de estas alteraciones. En ésta se puede observar como W303 presenta una relación de 4, mientras que los mutantes simples presentan todos valores inferiores, entre 2,5 y 4, mostrando además un comportamiento similar entre D4 (sin P2 α) y D6 (sin P1 β). En sentido opuesto, los dobles mutantes se sitúan en torno a 5 salvo el D46 (que no expresa P2 α ni P1 β) con un valor cercano a 6 y que parece mostrar, por tanto, cierta cooperación de los efectos encontrados en D4 y D6. En cambio, en los triples mutantes esta relación es más homogénea que en los grupos de mutantes indicados hasta el momento y presenta valores más bajos (en torno a 1,7), si bien, la cepa D4567, que no expresa ninguna proteína P y cuya composición del tallo es formalmente idéntica, presenta una relación sorprendentemente alta, equiparable a la de W303, de 3,6. La bajada de la relación polisomas/80S encontrada en mutantes dobles que unen proteínas al tallo y en mayor grado en todos los mutantes triples sugiere problemas en el complejo de iniciación que dificultan la elongación, con la aparición de estructuras ribosómicas 80S inactivas que no se unen al mRNA y monosomas constituyendo complejos de iniciación improductivos.

Tabla 4.20. Cuantificación de la relación entre las diferentes estructuras ribosómicas indicadas.

	60S/40S*	80S/60S	Polisomas/80S
W303	2,1 \pm 0,1	3,7 \pm 0,5	4,1 \pm 0,8
D4	1,6	2,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2
D5	1,8	2,1 \pm 0,1	4,1 \pm 0,2
D6	1,6	2,3 \pm 0,3	2,9 \pm 0,1
D7	1,9	4,07	3,3 \pm 0,2
D45	2,1 \pm 0,1	4,3 \pm 0,4	4,5 \pm 0,1
D46	1,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2	5,9 \pm 1,1
D47	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2
D56	1,6 \pm 0,08	1,3 \pm 0,4	5,1 \pm 0,5
D57	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	5,0 \pm 0,3
D67	2,0 \pm 0,2	4,7	4,9
D456	-	5,6 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
D457	-	5,10	1,6 \pm 0,1
D467	-	8,53	1,8 \pm 0,1
D567	-	3,31	1,9 \pm 0,2
D4567	2,0 \pm 0,1	3,4 \pm 0,4	3,6 \pm 0,3

*Valores obtenidos de perfiles de disociación, figura 4.14.

IV.2.2. GRADIENTES DE DISOCIACIÓN.

Se obtuvieron perfiles de polirribosomas en gradientes lineales de sacarosa del 10% al 30%, en condiciones disociativas para los ribosomas y se analizaron las relaciones existentes entre las dos subunidades ribosómicas: 40S y 60S (figura 4.14).

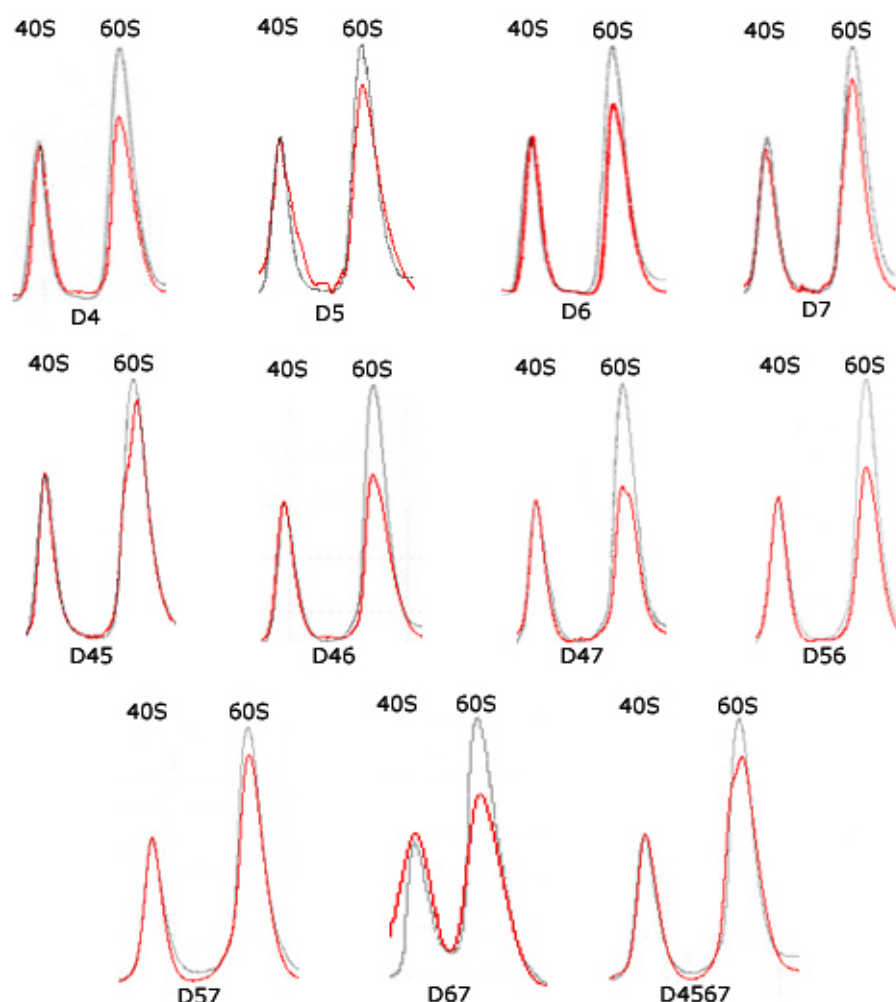


Figura 4.14. Perfiles de disociación. Se muestran los perfiles de disociación de las cepas mutantes (D4, D5, D6, D7, D45, D46, D47, D56, D57, D67 y D4567) en color rojo superpuestos a W303 (gris). Se aprecian las alteraciones en la relación entre picos 40S y 60S debidas a la presencia de proteínas ácidas en dichas cepas.

El análisis matemático de las relaciones entre las subunidades 40S y 60S de cada cepa (ver tabla 4.20) se realizó en base a la cuantificación relativa de las áreas encerradas bajo los picos correspondientes que se observan en las gráficas. Éste parece reflejar tres tipos de perfiles o grupos de comportamiento de las levaduras en la traducción dependiendo de la composición en proteínas ácidas que tenga el tallo ribosómico. De esta forma, se pueden establecer los siguientes grupos: W303, en torno a 2,1 y las cepas sin proteínas ácidas en el tallo, D45, D67 y D4567, que presentan un valor en la relación de picos 60S/40S similar a W303; D5, D7 y D57 (cuyo tallo carece de la/s proteína/s P2 β ,

P1 α o ambas, respectivamente) con valores en torno a 1.85; D4, D6, D46, (tallos sin P2 α , P1 β , ambas,) y los mutantes D47 (sin P1 α y P2 α) y D56 (sin P1 β y P2 β), que se comportan de forma similar con valores en torno a 1,60. Esta aparente disminución de subunidades 60S indica que pueden existir defectos en el ensamblaje de las mismas, y que los efectos de la presencia o ausencia de las proteínas P1 α y P2 β tienen carácter dominante sobre los de P1 β y P2 α .

IV.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS AL RIBOSOMA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

La regulación diferencial de la expresión de determinados genes en D4567 puede ser llevada a cabo mediante el control de los mensajeros a los cuales se une el ribosoma, o mediante la mejora selectiva de la eficacia de la traducción de este conjunto de genes/mensajeros regulados. Es posible que esta regulación no sea causa directa de la composición en proteínas ácidas del tallo, sino que éstas, de forma indirecta, controlen la unión al ribosoma de otras proteínas o factores que tengan dicha actividad reguladora. Para identificar estas proteínas se pensó en purificar los ribosomas en condiciones parecidas a la fisiológica. Estos ribosomas se trataron a diferentes concentraciones de sal para identificar cambios en las proteínas asociadas a 80S y/o en la afinidad de las uniones, entre el mutante D4567 y el silvestre W303.

IV.3.1. GRADIENTES PREPARATIVOS.

Se intentó aprovechar esta metodología para purificar ribosomas (monosomas y polisomas) a partir de gradientes continuos de sacarosa en condiciones preparativas, con mayor volumen (36 ml) y capacidad de carga de muestra que los gradientes analíticos utilizados en el estudio anterior. Sin embargo, las cantidades de ribosomas que se lograron purificar a partir de este sistema no eran suficientes para que la cantidad de proteínas eluidas de éstos pudieran ser separarlas mediante electroforesis bidimensional.

IV.3.2. PURIFICACIÓN DE RIBOSOMAS CON EL EPÍTOPO TAP.

Se siguió intentando purificar ribosomas en condiciones lo más parecidas posible a las intracelulares para disminuir la pérdida de proteínas y/o factores asociados durante el proceso. La purificación a partir de un S30 empleando columnas de afinidad parecía cumplir este requisito, por lo que se diseñó una estrategia utilizando el epítipo TAP fusionado a una proteína ribosómica. Se escogió la proteína L25 ya que es esencial, está codificada por un único gen, se ha descrito su uso fusionada a un epítipo marcador (73), y se incorpora al ribosoma como una única molécula en fases tempranas del ensamblaje (44).

La construcción con la secuencia codificante del TAP fusionada al marcador de prototrofia *TRP1* que se encuentra en el vector pBS1479 (ver tabla 2.3) se amplificó mediante PCR

empleando los oligonucleótidos adecuados (L25_5TA y L25_3TA, ver tabla 2.4). Las secuencias de estos oligonucleótidos son complementarias a esta construcción y al gen *RPL25* de *Saccharomyces cerevisiae*. L25_5TA contiene 50 nucleótidos idénticos al extremo 3' de la ORF de *RPL25* sin el codón de parada de la traducción y 25 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia del epítipo TAP, mientras que L25_3TA contiene 25 nucleótidos del extremo 3' del marcador de prototrofia y 50 nucleótidos del extremo 5' de la región 3'UTR de *RPL25*. En estos experimentos se emplearon las cepas W303, silvestre con tallo ribosómico completo, y D457, mutante defectivo en tres proteínas ácidas que presenta auxotrofia para el triptófano, lo cual permite el empleo de la construcción L25TAPTRP portadora del marcador de prototrofia para dicho aminoácido, y con una composición idéntica a D4567 a efectos de unión de las proteínas ácidas al tallo ribosómico, pues sólo expresa la proteína P2 β , que es degradada. Ambas cepas se transformaron con estos productos de PCR, que quedaron integrados en el genoma mediante recombinación homóloga entre sus extremos y las secuencias de correspondientes del genoma de la levadura. La integración correcta se comprobó mediante ensayos de PCR, realizada sobre el DNA genómico extraído de cada cepa, empleando dos oligonucleótidos cuyas secuencias son complementarias a dos regiones de *RPL25* externas y flanqueantes a la estructura L25:TAP:TRP (L25intron y L253'UTR, ver tabla 2.4), como puede verse en la figura 4.15A. En la imagen se pueden apreciar las bandas correspondientes a la amplificación de *RPL25* con los oligonucleótidos indicados en las cepas sin transformar (1150 pb) y cómo las cepas transformadas presentan un producto de amplificación de mayor tamaño, correspondiente a la amplificación de la estructura integrada correctamente (2700 pb). También se demostró la expresión de la proteína quimérica L25TAP mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE y posterior Western-blot de un extracto total de las cepas transformadas (ver figura 4.15B).

Una vez observada la expresión de la proteína L25TAP, se intentó su purificación mediante columnas de afinidad siguiendo el método de Purificación por Afinidad en Tandem descrito en ⁽¹⁴²⁾ y, por tanto, de los ribosomas de los que se encuentra formando parte. La purificación con columnas de afinidad permite obtener ribosomas bajo unas condiciones suaves de manipulación de la muestra que evitan la disociación o la elución de las proteínas y factores asociados a los ribosomas, que no serían posible mediante otras técnicas que someten la muestra a sucesivas centrifugaciones o emplean soluciones con mayor concentración de sales. Sin embargo, los ensayos realizados para purificar ribosomas portadores de L25TAP no fueron satisfactorios como puede verse en la figura 4.16. El anticuerpo muestra la presencia de L25TAP en el *flowthrough* de la columna con IgG (FTG) y el primer lavado, no quedando retenida a la columna de afinidad de IgG ni por tanto eluidas en las purificaciones siguientes.

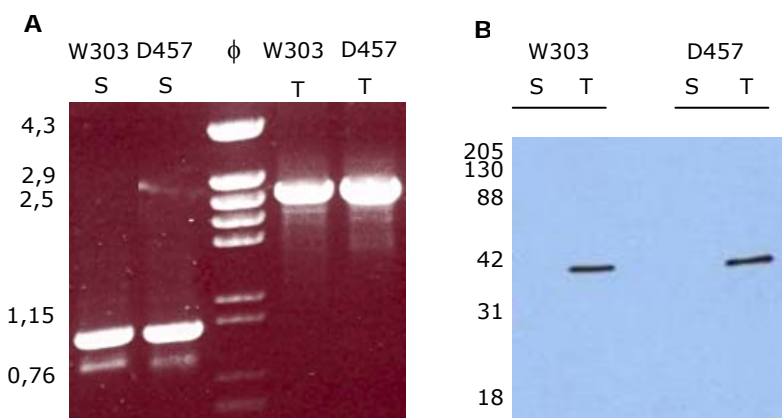


Figura 4.15. Epítipo TAP. (A) Electroforésis en gel de agarosa de los productos de PCR del genoma de levadura transformadas empleando los oligos L25intron y L253'UTR para demostrar la integración de la estructura RPL25TAPTRP. (B) Expresión de la quimera L25TAP puesta de manifiesto mediante un Western-blot empleando únicamente el anticuerpo secundario. S: cepa sin transformar. T: cepa transformada con L25TAPTRP.

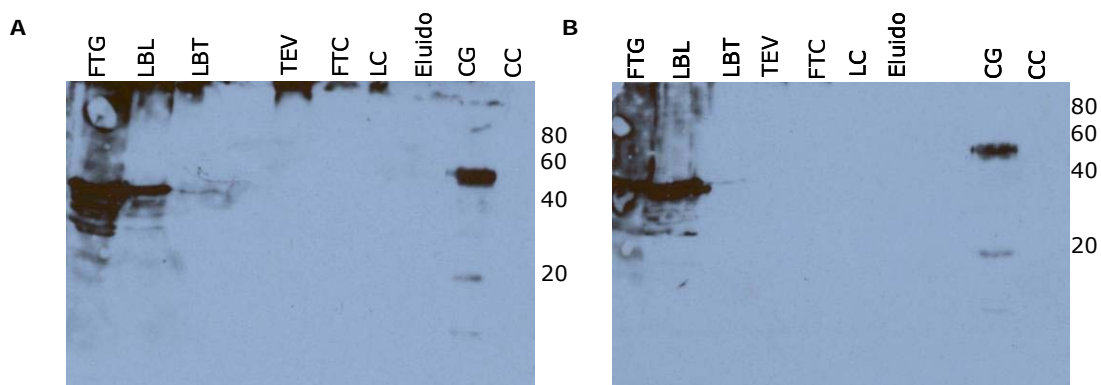


Figura 4.16. Purificación por TAP. Western-blot con α L25, de fracciones recolectadas del proceso de purificación en columna de afinidad (A) W303, (B) D4567. LBL: lavados con buffer de lisis, LBT: lavados con buffer de TEV, TEV: corte con la enzima TEV, FTC: *flowthrough* de la columna de calmodulina, LC: lavado de columna de calmodulina, Eluido: elución final de la columna de calmodulina con la proteína purificada, CG: resina de la columna de IgG, CC: resina de la columna de calmodulina.

IV.3.3. LAVADO SALINO DE RIBOSOMAS (RSW).

Debido al fracaso en la estrategia de purificación de ribosomas mediante el epítipo TAP para someterlos a diferentes condiciones de lavado salino y estudiar las proteínas o factores que interaccionan con éste, se procedió a la purificación de ribosomas utilizando técnicas bioquímicas convencionales, como la centrifugación diferencial en gradientes continuos de sacarosa.

IV.3.3.1. Western-blot de factores asociados a ribosoma.

El tallo es una estructura presente en todos los ribosomas que interacciona con los factores de elongación eEF1A y eEF2, por lo que estos factores se emplearon como control de eficacia de los lavados, mediante ensayos de Western-blot con anticuerpos frente a los mismos. En los Western-blots con el anticuerpo frente a eEF2, desarrollado en nuestro laboratorio, nos hemos encontrado con un resultado bastante inesperado. Como puede observarse en la figura 4.17, las bandas reveladas con este anticuerpo correspondientes a proteínas con el peso molecular esperado (95 kDa) aparecen de forma evidente como proteína remanente en los *core* ribosómicos tras lavarlos con 100 mM y 500 mM en el caso de la cepa silvestre W303, y de forma casi inapreciable en D4567. Sin embargo aparece una proteína de menor peso molecular pero aún reconocible por el anticuerpo, lo que indica la presencia de una forma truncada, o controladamente degradada, del mismo factor que es incapaz de soltarse del ribosoma a las concentraciones de lavado ensayadas. En las muestras procedentes de lavados salinos a las concentraciones indicadas, el comportamiento de eEF2 es similar en ambas cepas, permaneciendo completamente unido al ribosoma en presencia de 100 mM y disociándose de éste solo en cierto grado, al alcanzar al menos una concentración en el medio de 500 mM de KAc. Sin embargo, la cantidad de factor 2 en los extractos de lavados a alta sal del mutante es sensiblemente menor que en el control, según se indica más arriba.

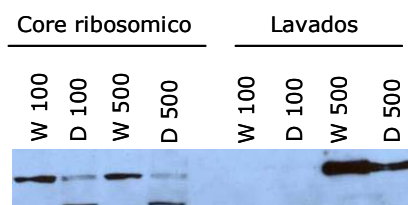


Figura 4.17. Factor eEF2. Se lava a 500 mM de KAc solo de forma parcial. Permanece en los *cores* lavados a 100 y 500 mM, y aparece un producto más pequeño en D4567.

IV.3.3.2. Separación de proteínas mediante electroforésis bidimensional.

Las proteínas obtenidas de los diversos lavados salinos realizados a estos ribosomas (a 100 y 500 mM de KAc), fueron resueltas en geles bidimensionales, de los cuales se muestran dos resultados representativos (figuras 4.18 y 4.19). El análisis manual de las imágenes de dichos geles permitió encontrar ciertas diferencias entre la cepa cuádruple mutante y la silvestre, que aparecían consistentemente en todos los experimentos. Estas proteínas seleccionadas fueron secuenciadas por la Unidad de Proteómica de CBMSO, y se muestran en la tabla 4.21.

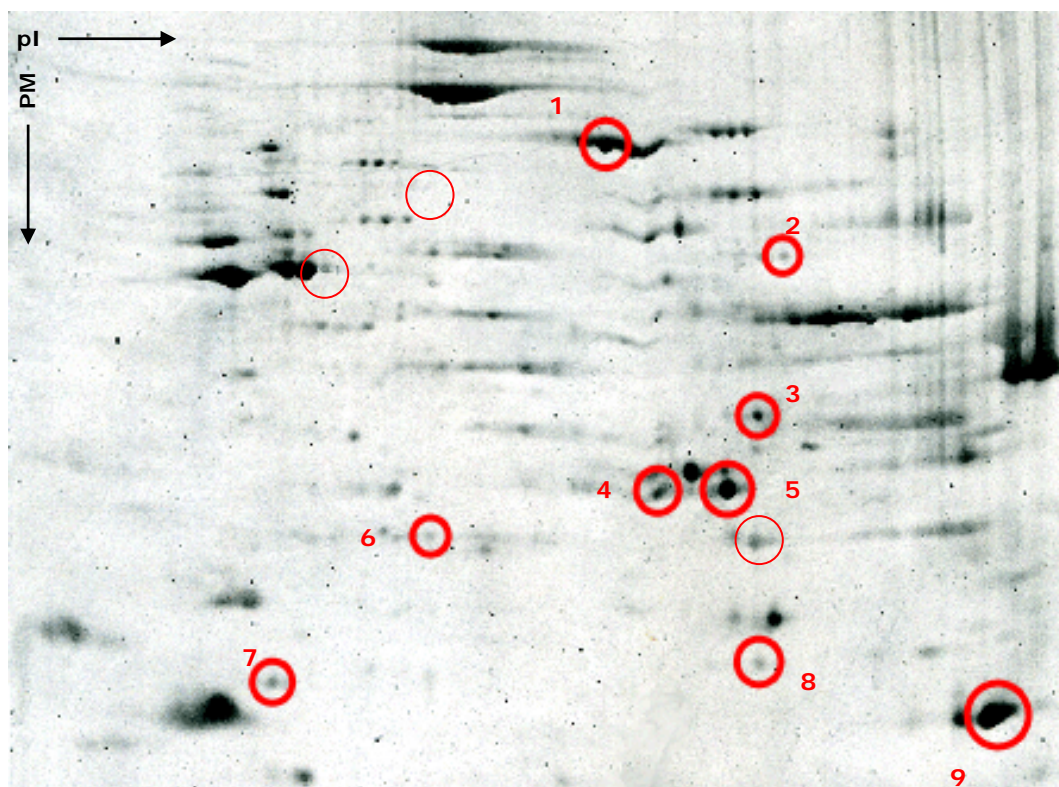


Figura 4.18. Gel bidimensional de W303. Imagen representativa del patrón de las proteínas lavadas del ribosomas de W303 a 500 mM de KAc. Se circulan las que muestran presencia o un aumento aparente de cantidad con respecto a D4567. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular.

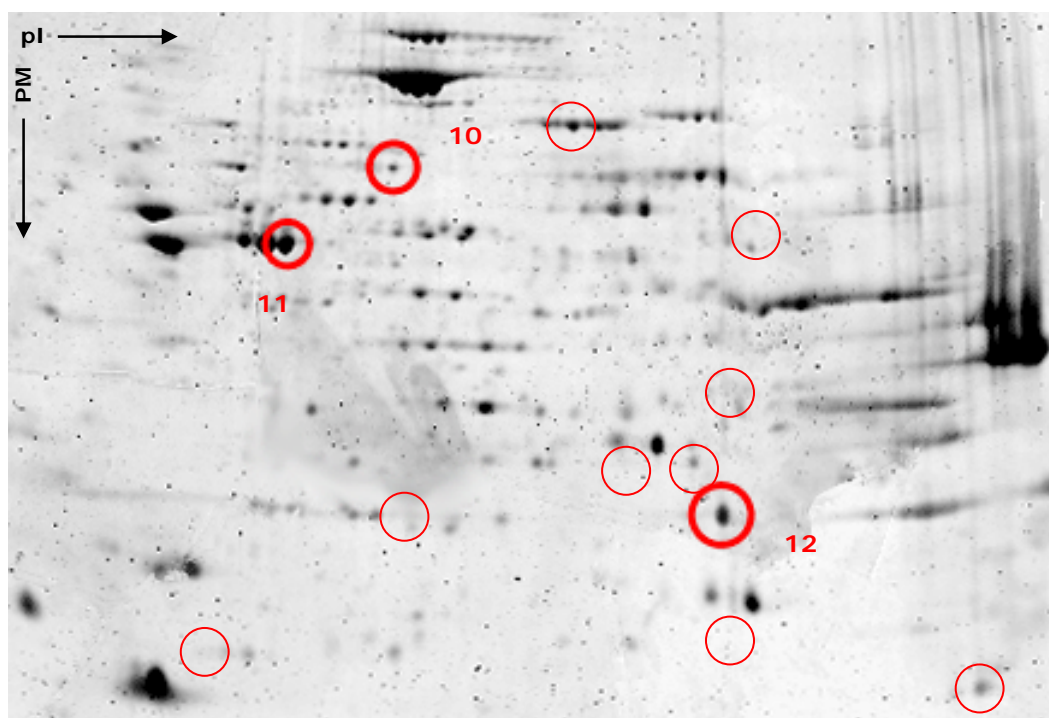


Figura 4.19. Gel bidimensional de D4567. Imagen representativa del patrón de las proteínas lavadas del ribosoma de D4567 a 500 mM de KAc. Se circulan las que muestran presencia o un aumento aparente en la cantidad con respecto a W303. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular.

Tabla 4.21. Proteínas asociadas de forma diferencial a ribosomas de W303 y D4567.
Listado de las proteínas que muestran diferencias entre las cepas W303 y D4567.

Expresión	Proteína	Descripción / Función
<i>Aumentados o exclusivos de W303</i>	1	Tef2p
	3	Cit1p
	4/5	Ilv5p
	7	Yor164cp
	8	Ylr412wp
	9	Gpm1p
<i>Aumentados o exclusivos de D4567</i>	10	Gag-pol
	11	Ssb1p
	6/12	Stm1p

Algunas de las proteínas identificadas se presentan asociadas únicamente a los ribosomas de una u otra cepa, mientras que otras se encuentran en ambas pero muestran diferencias de cantidad notables. Entre las proteínas asociadas únicamente a los ribosomas de una cepa, se han identificado 3 asociadas a los de W303: la citrato sintasa (3), enzima metabólica del ciclo de ácidos tricarboxílicos, Ylr204wp (8), sin función conocida que se induce en respuesta a daños en el DNA por alquilación con MMS, e Yor164cp, sin función conocida, aunque se ha descrito su interacción con Mdy2p y está implicada en la conjugación eficiente, fenotipo *Shmoo*, y la migración nuclear en estado prezigótico; mientras que sólo una se asocia exclusivamente a los ribosomas de D4567, la cápsida del virus L-A (10). El resto de proteínas identificadas se asocian a los ribosomas de ambas cepas, si bien existen diferentes patrones en lo referente a cantidad de proteína y/o diferentes isoformas de ésta asociadas a dichos ribosomas. Así, eEF2 (1), se presenta asociado al ribosoma de W303 en mayor cantidad que al de D4567, en un comportamiento similar al observado en el Western-blot presentado en la figura 4.18, al igual que ocurre con Ilv5p (4 y 5), asociada a ribosomas de ambas cepas, aunque a niveles muy superiores en W303 donde además se presenta de forma exclusiva una isoforma con un punto isoelectrico más ácido, y con Gpm1p (9), implicada en la esporulación, presente en ribosomas de W303 en cantidades superiores a la mayoría de las otras proteínas identificadas y prácticamente ausente en D4567. En la vertiente opuesta, Ssb1p (11) se ha encontrado asociada a los ribosomas de ambas cepas, si bien en los de D4567 presenta una isoforma más básica, probablemente con menor grado de fosforilación, ausente en los ribosomas de W303, y Stm1p (6 y 12) asociada a los ribosomas de ambas cepas, aunque de forma mayoritaria en el caso de D4567. De forma inesperada, la isoforma asociada exclusivamente a W303 presenta una notable disminución del punto isoelectrico teórico para esta proteína, en torno a 9, que sí es mostrado por la especie común a W303 y D4567.

V. Discusión.

Mire vuestra merced, que aquellos que allí se parecen no son genes sino manchas.
Sancho Panza en "El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha" de Miguel de Cervantes.
Adaptación.

En este trabajo se han analizado las diferencias de expresión génica entre las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* W303 (cepa silvestre) y D4567 (cepa que no expresa ninguna de las proteínas ácidas P1/P2 y, por tanto, el tallo ribosómico presenta su estructura mínima). Al igual que cualquier otro estímulo o cambio sufrido por la célula, las perturbaciones en esta estructura esencial provocan una respuesta, basada en cambios en la expresión de genes necesarios para adaptarla a esta nueva condición. Las células de los mutantes empleados en este trabajo se encuentran en dicho estado de adaptación a la composición de su tallo, alterada con respecto a la cepa silvestre W303. La utilización de microarrays ha permitido conocer variaciones en el patrón de transcripción génica, y la traducción de esos mRNAs, asociadas a la presencia o ausencia de proteínas P en el tallo ribosómico. Relacionado con estas alteraciones en la expresión génica, se han caracterizado también cambios en los factores proteicos asociados a ribosomas con o sin proteínas P1/P2 en el tallo. En conjunto, la ausencia de proteínas P en el tallo y los cambios asociados a la diferente interacción con los factores solubles producen un defecto en el proceso de ensamblaje e iniciación de la síntesis de proteínas.

V.1. PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN/TRADUCCIÓN DE MUTANTES DEFICIENTES EN EL TALLO RIBOSÓMICO.

El objetivo más ambicioso de este trabajo ha sido analizar el transcriptoma (conjunto de mRNA celular total) y el traductoma (mRNAs asociados a polisomas) de la cepa D4567, deficiente en las proteínas P1/P2, y su parental W303. Para ello se han realizado hibridaciones en microarrays, utilizando tres plataformas distintas, y se ha analizado de manera cualitativa y cuantitativa el patrón de expresión con objeto de identificar mRNAs que se traduzcan diferencialmente por ribosomas con/sin el tallo ribosómico completo.

V.1.1. Comparación de las plataformas de microarrays.

Se han utilizado tres plataformas de biochips, una de ellas con cDNAs impresos al soporte (Y64K) y dos con oligonucleótidos (YG1.1 e YGS98). De éstas, las de Affymetrix (YGS98) (2, 33) se fabrican mediante síntesis *in situ* de las muestras (oligonucleótidos de 25 mer) y las de la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (YG1.1) mediante imprimación a una capa de aminosilanos y fijación con luz UV (146). Estas dos plataformas de oligonucleótidos contienen elementos que no son ORFs, como los genes mitocondriales, y en el caso de YGS98 además otros elementos como Tys, tRNAs, etc. En general, si nos centramos en los genes que muestran mayor variación en su expresión, los resultados cualitativos obtenidos con las tres plataformas son coherentes, ya que todas ellas identifican una población común cuya expresión (tanto en transcriptoma como en traductoma) varía más de 2,5 veces. Variaciones por debajo de este nivel muestran más fluctuaciones entre las tres plataformas. Puesto que el mayor

número de muestras han sido analizadas utilizando el sistema de oligoarrays YG1.1, estos resultados son los que tienen un mayor valor estadístico, y han servido de base para el análisis de los cambios de expresión génica que tienen lugar en la levadura *S. cerevisiae* cuando se eliminan los componentes P1/P2 del tallo ribosómico.

Un aspecto importante en relación con estos datos es el valor cuantitativo que se obtiene de los mismos. Se han realizado experimentos de QRT-PCR para validar los datos de microarrays y, en general, los resultados obtenidos a partir de los tres diferentes sistemas de biochips son representativos de la tendencia que muestra la variación en la expresión génica que detectan. Estos ensayos, al mismo tiempo, nos mostraron que para abordar el problema experimental planteado en este trabajo, el sistema que mejor se ajusta de forma cuantitativa a los resultados obtenidos por QRT-PCR es el de chips de cDNA, por encima de los otros dos empleados. Desconociendo este dato a priori, la elección de YG1.1 como sistema principal de experimentación se basó en razones tanto económicas como de proximidad y, por tanto, de eficacia.

V.1.2. Expresión diferencial en D4567 vs. W303.

A priori no era de esperar ver diferencias notables en el patrón de transcripción de los mutantes deficientes en el tallo ribosómico en comparación con el silvestre, puesto que no se ha descrito ninguna implicación de las proteínas ácidas en transcripción. Sin embargo, se han encontrado alteraciones en la expresión transcripcional de un grupo de genes en D4567 de forma diferencial a W303. Estas variaciones encontradas serían consecuencia de la adaptación de las células a un tallo ribosómico mínimo, siendo por tanto responsables de las diferencias fenotípicas descritas entre estas cepas: tiempo de duplicación mayor ⁽¹³⁷⁾, distinta sensibilidad a varias condiciones ambientales, como presencia de sal o respuesta a altas temperaturas ⁽¹⁴⁵⁾, no esporulación ⁽¹³⁸⁾, etc. Los genes que presentan mayores alteraciones en su transcripción de forma diferencial entre D4567 y W303 también las presentan en traducción. Estos genes se distribuyen en dos grupos según la función que desempeñan: (i) Genes de procesos metabólicos y (ii) Genes de respuesta a estímulos de estrés y mitocondriales.

V.1.2.1. Genes de procesos metabólicos.

V.1.2.1.1. Regulón del fosfato. Los aspectos más destacables de este conjunto de genes diferencialmente expresados en D4567 con respecto a W303 son la presencia de muchos de los genes relacionados con metabolismo del fosfato, o regulón *PHO* ^(54, 79, 115, 119M, 189, 201), y los fuertes niveles de represión de la transcripción y traducción de dichos genes en el mutante, alcanzándose en algunos casos valores de represión del mismo orden que los genes que codifican las proteínas P, que sabemos no se están expresando en estas cepas. Aquí se incluyen el transportador de alta afinidad, fosfatasas, genes

implicados en síntesis y acumulación de polifosfatos en vacuola, etc (45, 115, 184). Sin embargo, no se han detectado diferencias en la expresión de los reguladores de la transcripción de esta ruta, como Pho4p ni Pho2p (factores de transcripción), Pho81p (inhibidor de Pho85p) y Pho80p-Pho85p (ciclina y kinasa dependiente) (116, 161), lo que muestra cierto grado de desacoplamiento entre la parte reguladora y ejecutiva de esta ruta (15). Teniendo en cuenta que los ensayos se han hecho cultivando las levaduras en alto fosfato, estos resultados indican una represión adicional sobre el nivel basal de la cepa silvestre, ya que el regulón se induce en ausencia de fosfato y en condiciones de alto fosfato sólo se expresan algunos genes (175). Cabría pensar en una relación directa (a través de alguna fosfatasa o quinasa) o indirecta (a nivel de la transmisión de señal desde el sensor de niveles de fosfato hasta el factor) entre la ausencia de proteínas P y el estado de fosforilación de Pho4p, que fosforilado se retendría en citoplasma, sin ejercer su función activadora de la transcripción en el núcleo (175).

V.1.2.1.2. Regulón de metionina. Además de los genes PHO, algunos genes MET se encuentran reprimidos en la cepa D4567, tanto en transcriptoma como en traductoma, (los biochips de Affymetrix, muestran la ruta completa desde *SUL2* hasta *MET6*). De nuevo, los genes reguladores como los factores de transcripción *MET4*, *MET28*, *MET31* y *MET32* no varían su expresión, mostrando cierto desacoplamiento entre los componentes de la ruta. Uno de los reguladores de los factores implicados en esta ruta, Cdc34, precisa ser fosforilado por la enzima Casein Kinasa II (CK2) para realizar su función activadora (129). Mutaciones en ésta última muestran reprimido el regulón MET (14) de manera similar a la observada en este trabajo.

Por otra parte, en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha descrito la interacción de cada una de las cuatro proteínas P con Asc1p (130), con implicación en alteraciones del regulón MET y en mitosis (73), así como en la represión de un conjunto de genes implicados en transporte de amonio y aminoácidos (entre ellos el glutamato) y funciones mitocondriales (98) coincidente con algunos de los genes encontrados en este trabajo (*MEP2*, *ACO1*, *GAP1*, *AGP1*, *PUT4*, *AGP1*, *YPS6*, *GNP1*, *YDR509*, etc). Aunque en D4567 no se han encontrado alteraciones en la expresión génica de *ASC1* ni en la asociación de Asc1p a ribosomas, otras alteraciones observadas en mutantes en este gen (167) coinciden nuevamente con los resultados descritos en este trabajo, como el aumento de halfmeros, bajada de la relación 80S/polisomas, implicación en procesos de apoptosis, y la modulación de la traducción de *CDC25*. Esto podría indicar que el fenotipo conocido de D4567 se debe a que la ausencia de proteínas ácidas en el tallo impide la interacción del ribosoma con Asc1p, aunque esta posible relación entre la ausencia de proteínas P y la afuncionalidad de Asc1p no es evidente.

V.1.2.1.3. Enzima Casein quinasa 2. El análisis con microarrays de cepas con mutaciones en esta quinasa ⁽¹⁵⁾ muestra una alta convergencia con los resultados que hemos obtenido con el mutante D4567, que podría ser interpretada como la consecuencia de la alteración de una ruta común a CK2 y las proteínas del tallo, o bien una respuesta básica de la levadura ante algún daño común producido por la ausencia de estas proteínas. De hecho, las proteínas P se fosforilan en su extremo carboxilo, siendo la casein quinasa II la enzima que cataliza esta fosforilación ^(1, 176). En condiciones fisiológicas, las proteínas P se encuentran unidas a PO, esencial en su forma fosforilada, lo que indica la importancia de este estado en el ensamblaje del tallo y posiblemente el desempeño de sus funciones. Los efectos observados en cepas mutantes para CK2, con proteínas P expresadas pero desfosforiladas, coinciden con los observados en este trabajo, en ausencia de proteínas P, por lo que sería posible que las alteraciones encontradas en los perfiles de expresión génica en D4567 se deban a que el tallo ribosómico muestre su estructura mínima, más que al hecho de que no existan proteínas ácidas en la célula. No obstante, las proteínas P no son el único sustrato de CK2 ⁽¹¹⁷⁾, por lo que la respuesta común puede ser consecuencia de procesos moleculares distintos. Para profundizar en esta conexión sería interesante analizar el patrón de transcripción de cepas en las que los residuos fosforilables de las proteínas ácidas sean sustituidos por otros no fosforilables.

Al igual que sucede con D4567, en los mutantes CK2 ⁽¹²²⁾, no sólo se altera la transcripción de los genes del regulón MET, sino que el desacoplamiento entre la parte reguladora también se produce en el regulón PHO ^(14, 15). En el caso de los genes MET, en ambos mutantes se produce una represión generalizada (que incluye *MET13* y *SAM3*) excepto el regulador *MET4*. Respecto al regulón PHO, en ambos mutantes se observa una represión de *PHO5*, *PHO84*, *SPL2* y en mayor medida de *PHO11* mientras que el regulador de la ruta *PHO4* permanece inalterado ⁽¹⁵⁾. De igual forma, la represión de *MFA1fa2* ⁽¹³⁾, uno de los dos que expresan la feromona alpha ⁽¹⁶⁹⁾, se detectó en ambos mutantes. Esta feromona se encuentra fuertemente reprimida en D4567, cepa con el mismo tipo sexual que la parental W303 y que, por tanto, debería comportarse como el resto de genes que codifican feromonas, sin expresarse de manera diferente en D4567 y W303. Las cepas deficientes en proteínas P son capaces de conjugar y formar diploides, aunque entre sí lo hacen con mucha menor eficiencia (datos no publicados), lo que podría estar relacionado con este defecto en la expresión de una de las feromonas.

Por otra parte, cepas mutantes en CK2 presentan alteraciones en ciclo celular y activación de mecanismos de apoptosis ⁽¹²⁹⁾. Es posible que los genes relacionados con apoptosis ^(132, 198) o procesos de muerte celular similares a apoptosis ^(94, 168) que se han encontrado activados en D4567 (*ACO1*, *AIF1*) puedan estar relacionados con la

desfosforilación total de proteínas ácidas (y parcial de P0) observada previamente en procesos apoptóticos (206).

V.1.2.2. Genes de respuesta a estrés y genes relacionados con la mitocondria.

Un conjunto de genes identificados mediante microarrays como alterados en su expresión, está relacionado con la función mitocondrial, alguno de los cuales participa además en procesos de respuesta a estrés (*HSP12*, *HSP60*, *NFS1*, *ACO1*, *AIF1*, *ATX1*, *PIC2*, *AI5_alfa*). La cepa D4567 parece mostrar una respuesta constitutiva a condiciones de estrés, como muestran algunos de los genes que se han identificados como activados, implicados en respuesta general a estrés (*HSP12*, *HSP60*), de tipo térmico (*NFS1*, *SPG3*) y osmótico (*HSP12*, *SGD1* y *GRE2*).

Los niveles de glutation podrían verse afectados debido a alteraciones en la expresión de transportadores (*OPT1*, *GTT2*) y enzimas implicadas en la síntesis (*GSH1*), que se encuentran reprimidos. Ésto podría alterar el estado redox celular, lo que provocaría una situación de estrés celular. La regulación redox en la célula depende no sólo de factores citosólicos sino también de la homeostasis redox de otros compartimentos como la vía secretora y la mitocondria. Alteraciones en estos mecanismos redox (que implican al glutation) pueden originar la acumulación de especies superóxido (99). Nuestros resultados han mostrado una leve regulación positiva de la traducción de *AIF1* (con funciones de respuesta a la presencia de esta especie reactiva de oxígeno), transportadores de metales como zinc y cobre (integrantes de enzimas pertenecientes a estos mecanismos de equilibrio redox) y de la vía secretora. Tomados en conjunto, estos resultados podrían sugerir la existencia de cierto nivel de estrés oxidativo en cepas sin proteínas P.

D4567 no es capaz de crecer a 37°C, al igual que el mutante D67, que expresa proteínas P2 pero cuyo tallo ribosómico tampoco presenta proteínas ácidas, aunque ambas recuperan esta capacidad en presencia de NaCl (145). El gen *SPG3* está reprimido en D4567 y es necesario para la supervivencia a alta temperatura en fase estacionaria, en la que aproximadamente la mitad de los ribosomas de W303 carecen de proteínas ácidas (151). Por tanto, aunque D4567 crezca en fase exponencial, el tallo ribosómico se encuentra siempre en "estado estacionario", y quizás sea una de las causas por las que D4567 es incapaz de crecer a alta temperatura.

También ven alterada diferencialmente su expresión en el mutante D4567 en relación a W303 genes de respuesta a estrés térmico relacionados con apoptosis (*ATX1*, *AIF1*, que además interrelacionan procesos de respuesta a estrés, transporte de iones y ciclo celular) u otras funciones de transporte o de obtención de energía (*PIC2*, *ACO1*).

Concluyendo, D4567 parece mostrar la activación de genes de respuesta a condiciones de estrés de forma constitutiva, que podría deberse a un estado basal de

estrés causado por la ausencia de proteínas ácidas en el tallo ribosómico. Sin embargo, la inviabilidad de esta cepa a 37° o niveles altos de NaCl, parece indicar la incapacidad de responder (o variar esta respuesta constitutiva) para adaptarse a condiciones diferentes o más restrictivas.

En relación con la función mitocondrial, se ha observado que el nivel de expresión de los mRNAs de genes mitocondriales (*COB*, *BI2*, *AI5alfa*, etc.) era reproduciblemente la mitad en el mutante D4567 que en la cepa W303. El significado real no es evidente, aunque sí hemos detectado un defecto en la distribución de mitocondrias en el mutante cuádruple, probablemente relacionado con su asociación al citoesqueleto. La morfología del sincitio tubular ramificado que forman las mitocondrias en el citoplasma de la cepa que no expresa proteínas ácidas se aparta del observado en W303, fragmentándose y localizándose periféricamente como ocurre en células en crecimiento exponencial tardío (124) o en células con la función respiratoria comprometida (195). La existencia de estas alteraciones en D4567 está apoyada por los estudios de la afectación de los procesos mitocondriales de respiración realizados mediante microarrays y otras aproximaciones (46, 98), en los que se ha revelado la alteración de la expresión de un conjunto de genes nucleares coincidentes con algunos de los genes con expresión y/o regulación diferencial encontrados en este trabajo: *BAT1*, *BAT2*, *ACO1*, *NCE103*, *HSP12*, *CIT1* (cuya proteína se encuentra asociada preferentemente a ribosomas de D4567), así como la afectación de las rutas de biosíntesis de glutamato, del metabolismo del amonio (*GAT1*, *MEP1*, *MEP2*), transportadores de aminoácidos (*AGP1*, *GAP1*, *GNP1*, *PUT4*, *DIC1*, *YPS6*) y de señalización TOR. Se puede concluir, por tanto, que la función mitocondrial se encuentra alterada en mutantes sin proteínas P. Asimismo, esta circunstancia podría estar relacionada con una característica de los cultivos deficientes en proteínas P, en los que de manera espontánea se genera un alto porcentaje (de hasta el 60%) de células *petite* (resultados no publicados del laboratorio), incapaces de crecer en un medio no fermentativo. Esto podría deberse a una “disfunción mitocondrial latente” (37), susceptible de estudios posteriores.

V.1.3. Regulación traduccional de la expresión génica de D4567.

A fin de alcanzar el objetivo principal, identificar genes sometidos a regulación diferencial de la traducción por el tallo ribosómico, se comparó la población de mRNAs asociados a polisomas en mutantes del tallo, con los de una cepa silvestre. Aunque las proteínas ácidas no se han implicado directamente en otros procesos biológicos distintos a la traducción, salvo la posible propagación del virus L-A (87), sí esperábamos ver cambios traduccionales que justificasen los fenotipos de estos mutantes: mayor tiempo de duplicación, sensibilidad a sal, respuesta a altas temperaturas, incapacidad de esporulación, etc. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, estas diferencias

pueden ser debidas a genes que se transcriben de forma diferente en D4567 y en W303. De hecho, la comparación directa de los genes que aparecen expresados diferencialmente tanto en transcriptoma como en traductoma, o únicamente en uno de los dos, mostró diferencias sutiles en aquellos que más varían sus niveles de expresión; es decir, los que se transcriben más (*HSP12*, *IMH1*, *ACO1*, *CTR3*, *NFS1*, *HSP60*) o menos (*PHO11*, *PHO12*, *MEP2*, *SPL2*, *GIT1*, *MFALFA2*) en el mutante D4567, generalmente aparecen asociados a polisomas en ésta cepa en mayor o menor cantidad respectivamente. Esto parece indicar una relación directa entre la expresión transcripcional y la tasa de traducción de estos mensajeros, sin una regulación aparente.

No obstante lo anteriormente dicho, el análisis cuantitativo de la variación de mRNAs en transcriptoma y traductoma nos ha permitido identificar aquellos genes cuya traducción posiblemente pueda estar regulada por la composición proteica del tallo ribosómico en *Saccharomyces cerevisiae*, encontrando un pequeño grupo de genes que muestran *potenciación de la expresión génica* ⁽¹²⁶⁾, entre los que destacan *NFS1*, *NCE103* (implicados en respuesta a estrés) e *YJR079W* (sin función conocida cuya mutación desacopla la función respiratoria). También se ha encontrado genes con otros mecanismos de regulación mediados por la ausencia o presencia de proteínas P1 y P2. La mayoría de genes regulados por estos mecanismos pertenecen al regulón PHO (tabla 4.16: *PHO5*, *PHO11*, *PHO12*, *VTC1*, *VTC3*, *VTC4*, *GIT1*, *PHO84*, *PHM6* y *SPL2*), cuya transcripción está reprimida en D4567 con respecto a W303 y cuya traducción, si bien sigue estando reprimida, está optimizada en el mutante con respecto al control. De igual forma se regula diferencialmente la traducción de algunos genes del regulón MET y de genes implicados en procesos de transporte de varios tipos: moléculas orgánicas, inorgánicas, cargadas, neutras, etc (ver tabla 4.16), entre los que destacan permeasas generales de aminoácidos y el transportador de alta afinidad por metionina *MEP2*.

En cualquier caso, los valores de expresión y regulación obtenidos para estos genes muestran variaciones pequeñas entre las dos cepas, lo que hace que aún siendo fiables, se vean condicionados por el límite de sensibilidad de la técnica, por lo que los resultados han de interpretarse con cautela. Esto puede deberse a que la regulación traduccional diferencial encontrada en este trabajo se lleve a cabo mediante mecanismos de actuación bastante finos. Estos mecanismos de regulación de la traducción no son destacables desde un punto de vista cuantitativo aunque sí cualitativo, puesto que permitirían una respuesta inmediata a diferentes estímulos, más rápidas que las que se establecen mediante mecanismos de regulación de la expresión génica que impliquen una respuesta a nivel transcripcional. Otra posible explicación del bajo nivel de regulación traduccional puede ser el hecho de que el mutante D4567 constituya un tipo celular adaptado a crecer sin proteínas ácidas, por lo que habría perdido este sistema de regulación dependiente de la dotación en proteínas P del tallo ribosómico.

El único gen de D4567 regulado diferencialmente en la traducción mediante potenciación positiva con función conocida es *NFS1*, que codifica una cisteína desulfurasa esencialmente mitocondrial ⁽¹⁰⁹⁾, con funciones claves en la maduración de las proteínas mitocondriales y citoplásmicas con núcleo de hierro y azufre (Fe/S) ⁽¹⁰⁸⁾. También está implicada en el *splicing* y la tiomodificación de los tRNA citosólicos y mitocondriales ^(83, 110), necesarios para el crecimiento a temperaturas altas extremas. Estos mecanismos de adaptación se desarrollan por la activación transcripcional de *NFS1* como respuesta a condiciones de estrés térmico ^(165, 166). El aparente estado basal de respuesta a estrés del mutante sin proteínas ácidas podría estar relacionado con la mayor tasa de transcripción y de traducción relativa de este gen en D4567 con respecto a W303.

V.1.3. EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DIFERENCIAL EN D46 Y D57.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de expresión y regulación diferencial con respecto a W303 de los mutantes D46 y D57, que expresan y unen al tallo ribosómico sólo un heterodímero canónico de proteínas P, muestran una disminución en la alteración de la expresión de un menor número de genes que el mutante D4567, que no expresa ni une al tallo ninguna proteína ácida. Esto indica que existe una atenuación de los efectos génicos encontrados en D4567 debida a la restitución de la composición del tallo ribosómico, aun cuando ésta sea parcial. Cabe señalar que ninguna de estas cepas mutantes muestra los defectos fenotípicos mostrados en D4567, con un comportamiento similar a W303 en este aspecto. Por otro lado, se han encontrado alteraciones puntuales en la expresión diferencial (con respecto a W303) de un grupo de genes exclusivos en cada mutante, que puede deberse a la existencia de funciones diferentes de cada uno de los heterodímeros de proteínas P.

V.2. PROTEÍNAS ASOCIADAS DIFERENCIALMENTE A RIBOSOMAS DE W303 Y D4567.

La expresión diferencial del genoma detectada en los mutantes D4567 frente a una cepa silvestre no necesariamente ha de ser la consecuencia única de la ausencia de las proteínas del tallo. Puesto que esta estructura es el sitio de interacción de distintos factores de traducción ⁽⁹⁾ se planteó hacer un estudio detallado de las proteínas que no se asocian o lo hacen con menor intensidad a los ribosomas de mutantes con un tallo mínimo. Para ello se aislaron las proteínas liberadas del ribosoma mediante lavado con alta sal y se resolvieron por electroforesis bidimensional. Entre las bandas secuenciadas encontramos enzimas metabólicos y proteínas con función conocida o desconocida, que serán objeto de estudios posteriores.

V.2.1. Factor de elongación de la traducción eEF2.

El factor de elongación de la traducción eEF2 muestra diferencias en su asociación a ribosomas con un tallo completo o deficiente. Se comprobó la presencia de una menor cantidad de factor asociado a ribosomas de D4567, debido al enriquecimiento en este mutante de una forma procesada del factor, de menor tamaño y que no se disocia del *core* ribosómico a 500 mM KAc como se pudo observar en ensayos previos de Western-blot. Se desconoce la funcionalidad de esta especie del factor eEF2 o el efecto que pueda ejercer sobre la elongación de la traducción o el crecimiento celular.

V.2.2. Proteína Stm1p.

Stm1p se asocia de forma diferencial a los ribosomas de D4567 y W303, mostrando la presencia exclusiva en ribosomas de W303 de una isoforma con un pI más ácido que el teórico, y una isoforma con pI esperado asociado a ribosomas de ambas cepas, si bien en mayor cantidad en D4567. La variación de pI observada en la isoforma más ácida, de varias unidades de pH, difícilmente puede ser explicada por la existencia de modificaciones post-traduccionales. El hecho de que esta especie de Stm1p se presente únicamente en W303, donde se expresan proteínas ácidas, podría sugerir una asociación con éstas resistente a las concentraciones de urea empleadas en el isoelectroenfoque (1^a dimensión) pero no al SDS del PAGE (2^a dimensión). Se ha descrito la asociación de Stm1p con proteínas ribosómicas y rRNA de partículas 80S y polisómicas (185), habiéndose confirmado su implicación en la traducción o en procesos asociados como plegamiento proteico o transporte (111). Stm1p facilita la asociación de las subunidades ribosómicas (29, 73, 185) permaneciendo unida al ribosoma 80S, y en menor grado a polisomas, con una estequiometría 1:1, lo que potencialmente lo convierte en modulador de la traducción en etapas de iniciación y elongación (186). Sin embargo, puesto que *STM1* no es esencial, al igual que las proteínas P, puede no ser necesario en la traducción de todos los mensajeros, siendo posible que desempeñe funciones de regulación de la traducción bajo determinadas condiciones y/o de mensajeros específicos (186). Según lo anterior, es posible que el aumento en la cantidad de Stm1p asociada a ribosomas que se observa en el mutante sin proteínas ácidas esté relacionado con el mecanismo de regulación diferencial de la traducción por ribosomas con un tallo mínimo.

Otros resultados publicados también relacionan *STM1* con alteraciones observadas en mutantes en el tallo ribosómico. Así, experimentos de hibridación comparativa en microarrays han establecido la implicación de *STM1* en esporulación (34), lo que puede estar relacionado con la ausencia de esporulación de D4567. Por otro lado se ha implicado en el metabolismo de secuencias autorreplicativas ARS (185), lo que puede estar relacionado con el aumento de la actividad en algunos genes solapantes o adyacentes a secuencias autorreplicativas subteloméricas ARS (IV.1.5.1). También se ha descrito

asociada al mantenimiento de elementos Y' proximales a telómeros ⁽⁶³⁾, lo que puede estar relacionado con el aumento de la actividad de secuencias Ty en D4567 observadas en los microarrays YGS98. Asimismo, mutantes *stm1Δ* muestran defectos en la recuperación de situaciones de estrés nutricional por escasez de nitrógeno y en procesos pseudoapoptóticos inducidos por estrés oxidativo con H₂O₂ ^(94, 183), lo que podría relacionar el aumento de Stm1p asociada a ribosomas de D4567 con la activación de genes implicados en mecanismos muerte celular (*AIF1*).

Finalmente, Stm1p, como integrante de la ruta de señalización TOR ^(50, 125, 147), también está implicada en la traducción bajo condiciones de estrés nutricional, así como en biogénesis del ribosoma y procesos de iniciación de la traducción, control de los niveles de permeasas de aminoácidos y procesos de autofagia ⁽¹⁸⁶⁾ que se han detectado igualmente alterados en este trabajo.

V.2.3. Proteína Ssb1p (Hsp70p).

Otra de las proteínas asociadas de forma diferencial a los ribosomas de D4567 y W303 es Ssb1p, que muestra diferencias en la asociación a ribosomas con un tallo completo o un tallo deficiente, presentando en este último una isoforma con punto isoeléctrico más básico, quizás debido a una falta de fosforilación de la misma. La relación entre esta posible modificación postraducciona y el tallo ribosómico no es evidente, salvo que las proteínas P actúen como cofactores que participen en procesos de fosforilación. Otra posibilidad es que dicha isoforma no sea una modificación post-transcripcional de Ssb1p sino una unión a ATP/ADP. En este sentido, se ha descrito la unión a ribosoma de Ssb1p–ATP y su asociación a la cadena peptídica nascente ^(112, 121). La forma Ssb1p-ADP (coherente con la isoforma identificada con un pI más básico) no pierde su capacidad de unión al péptido nascente aunque sí disminuye la cinética de asociación y disociación al mismo ⁽¹²¹⁾ y posiblemente la eficiencia del plegamiento de éste. La asociación mayoritaria a los ribosomas de D4567 de esta isoforma “lenta” ⁽²⁸⁾ menos activa, podría favorecer la formación de plegamientos incorrectos en algunas proteínas que salen del ribosoma, ocasionando a esta cepa un estrés continuo por *missfolding*, como el que ocurre en cultivos a 37°C ⁽⁸⁸⁾, pudiendo ser la base de la respuesta constitutiva a estrés observada.

V.3. EFECTOS EN ESTRUCTURAS POLISÓMICAS.

El intento de caracterización de la relación entre los ribosomas citoplasmáticos y la mitocondria nos llevó a separar la población ribosómica en gradientes continuos de sacarosa, para analizar la distribución de polisomas en presencia de cicloheximida. Así pudimos observar en el mutante cuádruple un perfil que muestra defectos en elongación (menor cantidad de ribosomas asociados en polisomas o menor promedio de ribosomas

por molécula de mRNA), y en iniciación (presencia de halfmeros). De todas las aproximaciones experimentales abordadas en este trabajo, ésta es la que resulta más factible de hacer extensiva a toda la colección de mutantes deficientes en las proteínas P1/P2 del tallo: simples, dobles, y triples. En general todos ellos parecen mostrar defectos en iniciación o en biogénesis de la subunidad 60S, lo que se refleja en un incremento de los picos de halfmeros, especialmente si sólo expresan un heterodímero (aún mayor si se trata de los heterodímeros no canónicos P1 α -P2 α ó P1 β -P2 β). De igual forma se observa una disminución en la relación polisomas/80S a causa del aumento en la formación de monosomas ó ribosomas no asociados a mRNA e inactivos, con un coeficiente de sedimentación 80S que los hace indistinguibles de los monosomas para esta técnica. No obstante, las distintas combinaciones de proteínas ácidas parecen variar este comportamiento, lo que sugiere una función diferente durante el proceso de formación del ribosoma activo. Así, los resultados obtenidos sugieren una mayor facilidad de asociación de subunidades para formar ribosomas (en ausencia de mRNAs) en los mutantes triples, donde las proteínas P que quedan en la célula no pueden unirse al ribosoma. Opuestamente, en presencia de proteínas P, el pico de ribosomas/monosomas es más bajo, y se produce un aumento de polisomas formados, lo que indica que la unión de los heterodímeros a la subunidad 60S favorece la formación de monosomas activos en traducción.

En conjunto, estos resultados muestran que la iniciación de la traducción en *Saccharomyces cerevisiae* se ve afectada por la composición del tallo ribosómico, siendo esencial para un proceso óptimo la presencia de dos heterodímeros de proteínas ácidas unidos a P0. La presencia de proteínas P favorecería la formación de monosomas frente a ribosomas, que en general se ven favorecidos por la ausencia de proteínas P en el tallo ribosómico. La efectividad de la iniciación disminuye si sólo hay presente un heterodímero, como se constata por el notable aumento en la cantidad de halfmeros.

En *Saccharomyces cerevisiae* coexisten diferentes poblaciones de ribosomas con diversa composición en el tallo (en su mayoría completos con dos heterodímeros de proteínas ácidas unidas a P0), y por tanto con diferente capacidad de ensamblaje. Los ribosomas con tallo incompleto muestran mayor tendencia a asociarse en ausencia de mRNAs, y por tanto de los factores de iniciación asociados a éstos. Esta minoría de ribosomas con tallo incompleto podrían formar parte de eventos de traducción de mensajeros atípicos: sin estructuras CAP, sin poli-A, con IRES, etc (en los que no participarían los factores de iniciación usuales).

Sin embargo, los resultados de microarrays no parecen mostrar enriquecimiento en esta clase de mRNAs, explicable en el caso de mensajeros sin poli-A, puesto que los procedimientos empleados para la purificación y tratamiento de muestras se basa en la presencia de esta estructura. En cualquier caso, la ausencia de estos mensajeros puede

deberse al hecho de que no observamos la respuesta de las células a la presencia de un tallo mínimo (situación en la que se haría evidente una mayor afinidad por determinados mensajeros), sino el estado de adaptación a esta condición, en la que expresan y regulan todo el conjunto de genes necesarios para su supervivencia. Por tanto, para detectar este posible enriquecimiento de mensajeros sería necesario diseñar un sistema en el que la expresión de los genes codificantes de proteínas ácidas esté sometida a un control que permita el cambio instantáneo de condición: expresión/represión.

VI. Conclusiones.

*¡Tierra!
Rodrigo de Triana*

1. El mutante D4567 presenta alteraciones en la transcripción de genes pertenecientes al regulón PHO, regulón MET, del gen *MFA1pha2*, genes de respuesta a estrés y genes relacionados con la mitocondria, que podrían ser responsables el fenotipo de esta cepa.
2. Las alteraciones observadas en la transcripción de estos genes en el mutante D4567 son similares a las encontradas en la traducción.
3. No parece existir una regulación cuantitativamente importante de mRNAs traducidos preferentemente por ribosomas sin proteínas ácidas.
4. Se han encontrado genes regulados de manera exclusiva en cada uno de los mutantes cuyo tallo ribosómico presenta únicamente el heterodímero canónico $P1\alpha$ - $P2\beta$, el $P1\beta$ - $P2\alpha$, ó ninguno de ambos.
5. Se han encontrado proteínas y factores que se asocian diferencialmente al ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae* según la composición del tallo, que podrían contribuir a explicar el fenotipo del mutante D4567.
6. La composición en proteínas ácidas del tallo altera la interacción entre las subunidades 40S y 60S.
7. Los diferentes heterodímeros de proteínas ácidas P1/P2 desempeñan funciones distintas durante al proceso de iniciación de síntesis de proteínas.

VII. Bibliografía.

El saber no ocupa lugar.

1. **Abramczyk, O., P. Zien, R. Zielinski, M. Pilecki, U. Hellman, and R. Szyszka.** 2003. The protein kinase 60S is a free catalytic CK2alpha' subunit and forms an inactive complex with superoxide dismutase SOD1. *Biochem Biophys Res Commun* **307**:31-40.
2. **Affymetrix.** Manufacturing Quality Control and Validation Studies of GeneChip® Arrays. Technical Notes.
3. **Anand, M., B. Balar, R. Ulloque, S. R. Gross, and T. G. Kinzy.** 2006. Domain and nucleotide dependence of the interaction between *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factors 3 and 1A. *J Biol Chem* **281**:32318-26.
4. **Andersen, C. B., T. Becker, M. Blau, M. Anand, M. Halic, B. Balar, T. Mielke, T. Boesen, J. S. Pedersen, C. M. Spahn, T. G. Kinzy, G. R. Andersen, and R. Beckmann.** 2006. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* **443**:663-8.
5. **Arava, Y.** 2003. Isolation of polysomal RNA for microarray analysis. *Methods Mol Biol* **224**:79-87.
6. **Arava, Y., F. E. Boas, P. O. Brown, and D. Herschlag.** 2005. Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. *Nucleic Acids Res* **33**:2421-32.
7. **Arava, Y., Y. Wang, J. D. Storey, C. L. Liu, P. O. Brown, and D. Herschlag.** 2003. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3889-94.
8. **Azuaje, F., and J. Dopazo.** 2005. Data Analysis and Visualization in Genomics and Proteomics, 2^a ed, vol. 1. John Wiley & Sons, West Sussex.
9. **Ballesta, J. P., and M. Remacha.** 1996. The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**:157-93.
10. **Ballesta, J. P., M. A. Rodriguez-Gabriel, G. Bou, E. Briones, R. Zambrano, and M. Remacha.** 1999. Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Microbiol Rev* **23**:537-50.
11. **Ballesta, J. P. G., E. Guarinos, J. Zurdo, P. Parada, G. Nusspaumer, V. Laliotti, J. Perez-Fernandez, and M. Remacha.** 2000. Structure of the Yeast Ribosomal Stalk., *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions.*, vol. 1. ASM Press., Washington, D.C.
12. **Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz.** 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**:905-20.
13. **Barz, T., K. Ackermann, G. Dubois, R. Eils, and W. Pyerin.** 2003. Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J Cell Sci* **116**:1563-77.
14. **Barz, T., K. Ackermann, and W. Pyerin.** 2006. Control of methionine biosynthesis genes by protein kinase CK2-mediated phosphorylation of Cdc34. *Cell Mol Life Sci* **63**:2183-90.
15. **Barz, T., K. Ackermann, and W. Pyerin.** 2003. Perturbation of protein kinase CK2 uncouples executive part of phosphate maintenance pathway from cyclin-CDK control. *FEBS Lett* **537**:210-4.
16. **Bashan, A., I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzen, J. Harms, M. Pioletti, H. Bartels, M. Gluehmann, H. Hansen, T. Auerbach, F. Franceschi, and A. Yonath.** 2001. High-resolution structures of ribosomal subunits: initiation, inhibition, and conformational variability. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**:43-56.
17. **Bashan, A., R. Zarivach, F. Schlutzen, I. Agmon, J. Harms, T. Auerbach, D. Baram, R. Berisio, H. Bartels, H. A. Hansen, P. Fucini, D. Wilson, M. Peretz, M. Kessler, and A. Yonath.** 2003. Ribosomal crystallography: peptide bond formation and its inhibition. *Biopolymers* **70**:19-41.
18. **Berrar, D. P., W. Dubitzky, and M. Granzow.** 2003. A Practical Approach to Microarray Data Analysis., 1 ed, vol. 1. Kluwer Academic Publishers., Norwell, Massachusetts.

19. **Black, M. A., and R. W. Doerge.** 2002. Calculation of the minimum number of replicate spots required for detection of significant gene expression fold change in microarray experiments. *Bioinformatics* **18**:1609-16.
20. **Blaschke, C., E. A. Leon, M. Krallinger, and A. Valencia.** 2005. Evaluation of BioCreAtIvE assessment of task 2. *BMC Bioinformatics* **6 Suppl 1**:S16.
21. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
22. **Brazma, A., P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, T. Gaasterland, P. Glenisson, F. C. Holstege, I. F. Kim, V. Markowitz, J. C. Matese, H. Parkinson, A. Robinson, U. Sarkans, S. Schulze-Kremer, J. Stewart, R. Taylor, J. Vilo, and M. Vingron.** 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**:365-71.
23. **Briones, C., and J. P. Ballesta.** 2000. Conformational changes induced in the *Saccharomyces cerevisiae* GTPase-associated rRNA by ribosomal stalk components and a translocation inhibitor. *Nucleic Acids Res* **28**:4497-505.
24. **Briones, E., C. Briones, M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 1998. The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem* **273**:31956-61.
25. **Brodsky, L., A. Leontovich, M. Shtutman, and E. Feinstein.** 2004. Identification and handling of artifactual gene expression profiles emerging in microarray hybridization experiments. *Nucleic Acids Res* **32**:e46.
26. **Caruthers, M. H., S. L. Beaucage, C. Becker, J. W. Efcavitch, E. F. Fisher, G. Galluppi, R. Goldman, P. deHaseth, M. Matteucci, L. McBride, and et al.** 1983. Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal* **3**:1-26.
27. **Cleveland, W. S., and S. J. Devlin.** 1988. Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.*:596-610.
28. **Conz, C., H. Otto, K. Peisker, M. Gautschi, T. Wolfle, M. P. Mayer, and S. Rospert.** 2007. Functional Characterization of the Atypical Hsp70 Subunit of Yeast Ribosome-associated Complex. *J Biol Chem* **282**:33977-84.
29. **Correia, H., R. Medina, A. Hernandez, E. Bustamante, K. Chakraborty, and F. Herrera.** 2004. Similarity between the association factor of ribosomal subunits and the protein Stm1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:733-7.
30. **Chakraborty, K., and A. Kamath.** 1988. Protein synthesis in yeast. *Int J Biochem* **20**:581-90.
31. **Cheadle, C., M. P. Vawter, W. J. Freed, and K. G. Becker.** 2003. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* **5**:73-81.
32. **Chen, Y., E. R. Dougherty, and M. L. Bittner.** 1997. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. *Journal of Biomedical Optics* **2**:364-74.
33. **Cho, R. J., M. J. Campbell, E. A. Winzler, L. Steinmetz, A. Conway, L. Wodicka, T. G. Wolfsberg, A. E. Gabrielian, D. Landsman, D. J. Lockhart, and R. W. Davis.** 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* **2**:65-73.
34. **Chu, S., J. DeRisi, M. Eisen, J. Mulholland, D. Botstein, P. O. Brown, and I. Herskowitz.** 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**:699-705.
35. **Dey, D., D. E. Bochkariov, G. G. Jokhadze, and R. R. Traut.** 1998. Cross-linking of selected residues in the N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* protein L7/L12 to other ribosomal proteins and the effect of elongation factor Tu. *J Biol Chem* **273**:1670-6.
36. **Diaconu, M., U. Kothe, F. Schlunzen, N. Fischer, J. M. Harms, A. G. Tonevitsky, H. Stark, M. V. Rodnina, and M. C. Wahl.** 2005. Structural basis for

- the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* **121**:991-1004.
37. **Dimmer, K. S., F. Navoni, A. Casarin, E. Trevisson, S. Ende, A. Winterpacht, L. Salviati, and L. Scorrano.** 2007. LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn Syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum Mol Genet.*
 38. **Dobbin, K., J. H. Shih, and R. Simon.** 2003. Statistical design of reverse dye microarrays. *Bioinformatics* **19**:803-10.
 39. **Dougherty, E. R., J. Barrera, M. Brun, S. Kim, R. M. Cesar, Y. Chen, M. Bittner, and J. M. Trent.** 2002. Inference from clustering with application to gene-expression microarrays. *J Comput Biol* **9**:105-26.
 40. **Dudoit, S., Y. H. Yang, T. P. Speed, and M. J. Callow.** 2002. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* **12**:111-39.
 41. **Durbin, B. P., and D. M. Rocke.** 2004. Variance-stabilizing transformations for two-color microarrays. *Bioinformatics* **20**:660-7.
 42. **Eisen, M. B., and P. O. Brown.** 1999. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* **303**:179-205.
 43. **Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein.** 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14863-8.
 44. **El-Baradi, T. T., H. A. Raue, C. H. De Regt, and R. J. Planta.** 1984. Stepwise dissociation of yeast 60S ribosomal subunits by LiCl and identification of L25 as a primary 26S rRNA binding protein. *Eur J Biochem* **144**:393-400.
 45. **El Alami, M., F. Messenguy, B. Scherens, and E. Dubois.** 2003. Arg82p is a bifunctional protein whose inositol polyphosphate kinase activity is essential for nitrogen and PHO gene expression but not for Mcm1p chaperoning in yeast. *Mol Microbiol* **49**:457-68.
 46. **Epstein, C. B., J. A. Waddle, W. t. Hale, V. Dave, J. Thornton, T. L. Macatee, H. R. Garner, and R. A. Butow.** 2001. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* **12**:297-308.
 47. **Erhardt, R. A., R. Schneider, and C. Blaschke.** 2006. Status of text-mining techniques applied to biomedical text. *Drug Discov Today* **11**:315-25.
 48. **Farabaugh, P. J., Q. Qian, and G. Stahl.** 2000. Programmed translational frameshifting, hopping and readthrough of termination codons. *In* N. Sonenberg, J. B. W. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational Control of Gene Expression*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
 49. **Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems, and R. A. Woods.** 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**:355-60.
 50. **Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg.** 2004. mTOR signaling to translation. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**:169-97.
 51. **Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver.** 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**:546, 563-7.
 52. **Gomez-Lorenzo, M. G., C. M. Spahn, R. K. Agrawal, R. A. Grassucci, P. Penczek, K. Chakraborty, J. P. Ballesta, J. L. Lavandera, J. F. Garcia-Bustos, and J. Frank.** 2000. Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *Embo J* **19**:2710-8.
 53. **Gonzalo, P., J. P. Lavergne, and J. P. Reboud.** 2001. Pivotal role of the P1 N-terminal domain in the assembly of the mammalian ribosomal stalk and in the proteosynthetic activity. *J Biol Chem* **276**:19762-9.
 54. **Gonze, D., S. Pinloche, O. Gascuel, and J. van Helden.** 2005. Discrimination of yeast genes involved in methionine and phosphate metabolism on the basis of upstream motifs. *Bioinformatics* **21**:3490-500.

55. **Grela, P., M. Helgstrand, D. Krokowski, A. Boguszevska, D. Svergun, A. Liljas, P. Bernado, N. Grankowski, M. Akke, and M. Tchorzewski.** 2007. Structural characterization of the ribosomal P1A-P2B protein dimer by small-angle X-ray scattering and NMR spectroscopy. *Biochemistry* **46**:1988-98.
56. **Gross, S. R., and T. G. Kinzy.** 2005. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat Struct Mol Biol* **12**:772-8.
57. **Guarinos, E., M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 2001. Asymmetric interactions between the acidic P1 and P2 proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk. *J Biol Chem* **276**:32474-9.
58. **Guarinos, E., C. Santos, A. Sanchez, D. Y. Qiu, M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 2003. Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol* **50**:703-12.
59. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
60. **Hanson, C. L., H. Videler, C. Santos, J. P. Ballesta, and C. V. Robinson.** 2004. Mass spectrometry of ribosomes from *Saccharomyces cerevisiae*: implications for assembly of the stalk complex. *J Biol Chem* **279**:42750-7.
61. **Harris, M. A., J. Clark, A. Ireland, J. Lomax, M. Ashburner, R. Foulger, K. Eilbeck, S. Lewis, B. Marshall, C. Mungall, J. Richter, G. M. Rubin, J. A. Blake, C. Bult, M. Dolan, H. Drabkin, J. T. Eppig, D. P. Hill, L. Ni, M. Ringwald, R. Balakrishnan, J. M. Cherry, K. R. Christie, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, S. Engel, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, E. L. Hong, R. S. Nash, A. Sethuraman, C. L. Theesfeld, D. Botstein, K. Dolinski, B. Feierbach, T. Berardini, S. Mundodi, S. Y. Rhee, R. Apweiler, D. Barrell, E. Camon, E. Dimmer, V. Lee, R. Chisholm, P. Gaudet, W. Kibbe, R. Kishore, E. M. Schwarz, P. Sternberg, M. Gwinn, L. Hannick, J. Wortman, M. Berriman, V. Wood, N. de la Cruz, P. Tonellato, P. Jaiswal, T. Seigfried, and R. White.** 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* **32**:D258-61.
62. **Hartigan, J. A.** 1975. *Clustering Algorithms*. Wiley, New York.
63. **Hayashi, N., and S. Murakami.** 2002. STM1, a gene which encodes a guanine quadruplex binding protein, interacts with CDC13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **267**:806-13.
64. **Hegde, P., R. Qi, K. Abernathy, C. Gay, S. Dharap, R. Gaspard, J. E. Hughes, E. Snesrud, N. Lee, and J. Quackenbush.** 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* **29**:548-50, 552-4, 556 passim.
65. **Helgstrand, M., C. S. Mandava, F. A. Mulder, A. Liljas, S. Sanyal, and M. Akke.** 2007. The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *J Mol Biol* **365**:468-79.
66. **Helser, T. L., R. A. Baan, and A. E. Dahlberg.** 1981. Characterization of a 40S ribosomal subunit complex in polyribosomes of *Saccharomyces cerevisiae* treated with cycloheximide. *Mol Cell Biol* **1**:51-7.
67. **Herrero, J., A. Valencia, and J. Dopazo.** 2001. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* **17**:126-36.
68. **Hibbs, M. A., D. C. Hess, C. L. Myers, C. Huttenhower, K. Li, and O. G. Troyanskaya.** 2007. Exploring the functional landscape of gene expression: directed search of large microarray compendia. *Bioinformatics* **23**:2692-9.
69. **Hinnebusch, A. G., and S. W. Liebman.** 1991. Protein Synthesis and Translational Control in *Saccharomyces cerevisiae*, p. 627-735. In J. R. Broach, J. R. Pringle, and E. W. Jones (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
70. **Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S.**

- Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfaro, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. Hogue, D. Figey, and M. Tyers. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**:180-3.
71. Huber, W., A. von Heydebreck, H. Sultmann, A. Poustka, and M. Vingron. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**:S96-104.
 72. Hutchison, J. S., B. Feinberg, T. C. Rothwell, and K. Moldave. 1984. Monoclonal antibody specific for yeast elongation factor 3. *Biochemistry* **23**:3055-63.
 73. Inada, T., E. Winstall, S. Z. Tarun, Jr., J. R. Yates, 3rd, D. Schieltz, and A. B. Sachs. 2002. One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *Rna* **8**:948-58.
 74. Inge-Vechtomov, S., G. Zhouravleva, and M. Philippe. 2003. Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol Cell* **95**:195-209.
 75. Invitrogen. <http://www.invitrogen.com>.
 76. Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**:249-64.
 77. Jacob, F., and J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**:318-56.
 78. Jose, M. P., H. Santana-Roman, M. Remacha, J. P. Ballesta, and S. Zinker. 1995. Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain. *Biochemistry* **34**:7941-8.
 79. Kaneko, Y., Y. Tamai, A. Toh-e, and Y. Oshima. 1985. Transcriptional and post-transcriptional control of PHO8 expression by PHO regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**:248-52.
 80. Kispal, G., P. Csere, C. Prohl, and R. Lill. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* **18**:3981-9.
 81. Kisselev, L. L. 1999. Translation termination and yeast prions. *Biochemistry (Mosc)* **64**:1337-41.
 82. Kohonen, T. 1995. Self-Organizing Maps. Springer.
 83. Kolman, C., and D. Soll. 1993. SPL1-1, a *Saccharomyces cerevisiae* mutation affecting tRNA splicing. *J Bacteriol* **175**:1433-42.
 84. Kovalchuk, O., R. Kambampati, E. Pladies, and K. Chakraborty. 1998. Competition and cooperation amongst yeast elongation factors. *Eur J Biochem* **258**:986-93.
 85. Kozak, M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**:1-34.
 86. Krokowski, D., A. Boguszewska, D. Abramczyk, A. Liljas, M. Tchorzewski, and N. Grankowski. 2006. Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol* **60**:386-400.
 87. Krokowski, D., M. Tchorzewski, A. Boguszewska, A. R. McKay, S. L. Maslen, C. V. Robinson, and N. Grankowski. 2007. Elevated copy number of L-A virus in yeast mutant strains defective in ribosomal stalk. *Biochem Biophys Res Commun* **355**:575-80.
 88. Kryndushkin, D., and R. B. Wickner. 2007. Nucleotide exchange factors for Hsp70s are required for [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**:2149-54.
 89. Kuhn, K. M., J. L. DeRisi, P. O. Brown, and P. Sarnow. 2001. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces*

- cerevisiae to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol Cell Biol* **21**:916-27.
90. **Kyrpides, N. C., and C. R. Woese.** 1998. Universally conserved translation initiation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:224-8.
 91. **Lalioti, V. S., J. Perez-Fernandez, M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 2002. Characterization of interaction sites in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk components. *Mol Microbiol* **46**:719-29.
 92. **Lee, M. L., F. C. Kuo, G. A. Whitmore, and J. Sklar.** 2000. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9834-9.
 93. **Lehninger, A. L., L. Nelson, and M. M. Cox.** 1995. *Principios de bioquímica*, 2^a ed, vol. 1. Ediciones Omega, Barcelona.
 94. **Ligr, M., I. Velten, E. Frohlich, F. Madeo, M. Ledig, K. U. Frohlich, D. H. Wolf, and W. Hilt.** 2001. The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol Biol Cell* **12**:2422-32.
 95. **Lindquist, S., and R. Petersen.** 1990. Selective translation and degradation of heat-shock messenger RNAs in *Drosophila*. *Enzyme* **44**:147-66.
 96. **Link, A. J., T. C. Fleischer, C. M. Weaver, V. R. Gerbasi, and J. L. Jennings.** 2005. Purifying protein complexes for mass spectrometry: applications to protein translation. *Methods* **35**:274-90.
 97. **Lipshutz, R. J., D. Morris, M. Chee, E. Hubbell, M. J. Kozal, N. Shah, N. Shen, R. Yang, and S. P. Fodor.** 1995. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* **19**:442-7.
 98. **Liu, Z., T. Sekito, C. B. Epstein, and R. A. Butow.** 2001. RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *Embo J* **20**:7209-19.
 99. **Lopez-Mirabal, R., and J. R. Winther.** 2007. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*.
 100. **Lucas-Lenard, J.** 1971. Protein biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **40**:409-48.
 101. **Marintchev, A., V. G. Kolupaeva, T. V. Pestova, and G. Wagner.** 2003. Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1535-40.
 102. **Mathews, C. K., and K. E. v. Holde.** 1996. *Bioquímica*, 2^a ed, vol. 1. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid.
 103. **Mathews, M. B., N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey.** 2000. Origins and Principles of Translational Control, p. 1-32. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational Control of Gene Expression*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
 104. **McCarthy, J. E.** 1998. Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1492-553.
 105. **Mitsui, K., T. Nakagawa, and K. Tsurugi.** 1988. On the size and the role of a free cytosolic pool of acidic ribosomal proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)* **104**:908-11.
 106. **Miyazaki, M., M. Uritani, K. Fujimura, H. Yamakatsu, T. Kageyama, and K. Takahashi.** 1988. Peptide elongation factor 1 from yeasts: purification and biochemical characterization of peptide elongation factors 1 alpha and 1 beta (gamma) from *Saccharomyces carlsbergensis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem (Tokyo)* **103**:508-21.
 107. **Moreau, Y., F. De Smet, G. Thijs, and K. Marchal.** 2002. Functional bioinformatics of microarray data: From expression to regulation. *Proc IEEE* **90**:1722-43.
 108. **Muhlenhoff, U., J. Balk, N. Richhardt, J. T. Kaiser, K. Sipos, G. Kispal, and R. Lill.** 2004. Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:36906-15.
 109. **Nakai, Y., M. Nakai, H. Hayashi, and H. Kagamiyama.** 2001. Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem* **276**:8314-20.

110. **Nakai, Y., N. Umeda, T. Suzuki, M. Nakai, H. Hayashi, K. Watanabe, and H. Kagamiyama.** 2004. Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem* **279**:12363-8.
111. **Nelson, L. D., M. Musso, and M. W. Van Dyke.** 2000. The yeast STM1 gene encodes a purine motif triple helical DNA-binding protein. *J Biol Chem* **275**:5573-81.
112. **Nelson, R. J., T. Ziegelhoffer, C. Nicolet, M. Werner-Washburne, and E. A. Craig.** 1992. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* **71**:97-105.
113. **Newton, C. H., L. C. Shimmin, J. Yee, and P. P. Dennis.** 1990. A family of genes encode the multiple forms of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins equivalent to the *Escherichia coli* L12 protein and a single form of the L10-equivalent ribosomal protein. *J Bacteriol* **172**:579-88.
114. **Nilsson, J., J. Sengupta, R. Gursky, P. Nissen, and J. Frank.** 2007. Comparison of fungal 80 S ribosomes by cryo-EM reveals diversity in structure and conformation of rRNA expansion segments. *J Mol Biol* **369**:429-38.
115. **Ogawa, N., J. DeRisi, and P. O. Brown.** 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**:4309-21.
116. **Oshima, Y.** 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **72**:323-34.
117. **Pagano, M. A., L. Cesaro, F. Meggio, and L. A. Pinna.** 2006. Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome'. *Biochem Soc Trans* **34**:1303-6.
118. **Perez-Fernandez, J., M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 2005. The acidic protein binding site is partially hidden in the free *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk protein P0. *Biochemistry* **44**:5532-40.
119. **Persson, B. L., J. Petersson, U. Fristedt, R. Weinander, A. Berhe, and J. Pattison.** 1999. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1422**:255-72.
120. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
121. **Pfund, C., N. Lopez-Hoyo, T. Ziegelhoffer, B. A. Schilke, P. Lopez-Buesa, W. A. Walter, M. Wiedmann, and E. A. Craig.** 1998. The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J* **17**:3981-9.
122. **Pinna, L. A.** 2002. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* **115**:3873-8.
123. **Planta, R. J., and W. H. Mager.** 1998. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:471-7.
124. **Pon, L., and G. Schatz.** 1991. Biogenesis of Yeast Mitochondria, p. 333-406. *In* J. R. Broach, J. R. Pringle, and E. W. Jones (ed.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, vol. Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
125. **Powers, T., I. Dilova, C. Y. Chen, and K. Wedaman.** 2004. Yeast TOR signaling: a mechanism for metabolic regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**:39-51.
126. **Preiss, T., J. Baron-Benhamou, W. Ansorge, and M. W. Hentze.** 2003. Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat Struct Biol* **10**:1039-47.
127. **Preiss, T., and W. H. M.** 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* **25**:1201-11.
128. **Proud, C.** 2000. Control of the Elongation Phase of Protein Synthesis, p. 719-39. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational Control of Gene Expression*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
129. **Pyerin, W., T. Barz, and K. Ackermann.** 2005. Protein kinase CK2 in gene control at cell cycle entry. *Mol Cell Biochem* **274**:189-200.
130. **Qiu, D.** 2004. Study of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk interactions with other ribosomal components using chemical cross-linking. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

131. **Qiu, D., P. Parada, A. G. Marcos, D. Cardenas, M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 2006. Different roles of P1 and P2 *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins revealed by cross-linking. *Mol Microbiol* **62**:1191-202.
132. **Qiu, J., J. H. Yoon, and B. Shen.** 2005. Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J Biol Chem* **280**:15370-9.
133. **Quackenbush, J.** 2001. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* **2**:418-27.
134. **Quackenbush, J.** 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* **32 Suppl**:496-501.
135. **RDML.** <http://medgen.ugent.be/rdml/>.
136. **Regev-Rudzki, N., S. Karniely, N. N. Ben-Haim, and O. Pines.** 2005. Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Mol Biol Cell* **16**:4163-71.
137. **Remacha, M., A. Jimenez-Diaz, B. Bermejo, M. A. Rodriguez-Gabriel, E. Guarinos, and J. P. Ballesta.** 1995. Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**:4754-62.
138. **Remacha, M., A. Jimenez-Diaz, C. Santos, E. Briones, R. Zambrano, M. A. Rodriguez Gabriel, E. Guarinos, and J. P. Ballesta.** 1995. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol* **73**:959-68.
139. **Remacha, M., M. T. Saenz-Robles, M. D. Vilella, and J. P. Ballesta.** 1988. Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**:9094-101.
140. **Remacha, M., C. Santos, and J. P. Ballesta.** 1990. Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**:2182-90.
141. **Remacha, M., C. Santos, B. Bermejo, T. Naranda, and J. P. Ballesta.** 1992. Stable binding of the eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for in vivo protein synthesis. *J Biol Chem* **267**:12061-7.
142. **Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin.** 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**:1030-2.
143. **Robertson, J. M., and W. Wintermeyer.** 1987. Shielding of the D loop of ribosome-bound tRNA by elongation factor G. *J Mol Biol* **198**:133-6.
144. **Rodnina, M. V., and W. Wintermeyer.** 2003. Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **13**:334-40.
145. **Rodríguez-Gabriel, M. Á.** 1997. La proteína ribosómica de P0 de *Saccharomyces cerevisiae*. Aspectos funcionales y estructurales. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
146. **Rodriguez-Pena, J. M., R. M. Perez-Diaz, S. Alvarez, C. Bermejo, R. Garcia, C. Santiago, C. Nombela, and J. Arroyo.** 2005. The 'yeast cell wall chip' - a tool to analyse the regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **151**:2241-9.
147. **Rohde, J. R., and M. E. Cardenas.** 2004. Nutrient signaling through TOR kinases controls gene expression and cellular differentiation in fungi. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**:53-72.
148. **Rothstein, R. J.** 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**:202-11.
149. **Sachs, A. B., and S. Buratowski.** 1997. Common themes in translational and transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* **22**:189-92.
150. **Sachs, A. B., P. Sarnow, and M. W. Hentze.** 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**:831-8.
151. **Saenz-Robles, M. T., M. Remacha, M. D. Vilella, S. Zinker, and J. P. Ballesta.** 1990. The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta* **1050**:51-5.

152. **Salas-Marco, J., and D. M. Bedwell.** 2004. GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol Cell Biol* **24**:7769-78.
153. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual., Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, New York.
154. **Santos, C., and J. P. Ballesta.** 2005. Characterization of the 26S rRNA-binding domain in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk phosphoprotein P0. *Mol Microbiol* **58**:217-26.
155. **Santos, C., and J. P. Ballesta.** 1995. The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *J Biol Chem* **270**:20608-14.
156. **Santos, C., and J. P. Ballesta.** 1994. Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem* **269**:15689-96.
157. **Santos, C., B. Ortiz-Reyes, T. Naranda, M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 1993. The acidic phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes. NH₂-terminal acetylation is a conserved difference between P1 and P2 proteins. *Biochemistry* **32**:4231-6.
158. **Schena, M.** 2003. Microarray analysis., 1^a. ed, vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
159. **Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown.** 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467-70.
160. **Schimmel, P.** 1987. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem* **56**:125-58.
161. **Schneider, K. R., R. L. Smith, and E. K. O'Shea.** 1994. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266**:122-6.
162. **Shalgi, R., M. Lapidot, R. Shamir, and Y. Pilpel.** 2005. A catalog of stability-associated sequence elements in 3' UTRs of yeast mRNAs. *Genome Biol* **6**:R86.
163. **Sharov, V., K. Y. Kwong, B. Frank, E. Chen, J. Hasseman, R. Gaspard, Y. Yu, I. Yang, and J. Quackenbush.** 2004. The limits of log-ratios. *BMC Biotechnol* **4**:3.
164. **Shenton, D., J. B. Smirnova, J. N. Selley, K. Carroll, S. J. Hubbard, G. D. Pavitt, M. P. Ashe, and C. M. Grant.** 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem* **281**:29011-21.
165. **Shigi, N., Y. Sakaguchi, T. Suzuki, and K. Watanabe.** 2006. Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. *J Biol Chem* **281**:14296-306.
166. **Shigi, N., T. Suzuki, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and K. Watanabe.** 2006. Temperature-dependent biosynthesis of 2-thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA. *J Biol Chem* **281**:2104-13.
167. **Shor, B., J. Calaycay, J. Rushbrook, and M. McLeod.** 2003. Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **278**:49119-28.
168. **Silva, R. D., R. Sotoca, B. Johansson, P. Ludovico, F. Sansonetty, M. T. Silva, J. M. Peinado, and M. Corte-Real.** 2005. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **58**:824-34.
169. **Singh, A., E. Y. Chen, J. M. Lugovoy, C. N. Chang, R. A. Hitzeman, and P. H. Seeburg.** 1983. *Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the alpha-factor pheromone. *Nucleic Acids Res* **11**:4049-63.
170. **Sonenberg, N., and T. E. Dever.** 2003. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**:56-63.
171. **Spahn, C. M., M. G. Gomez-Lorenzo, R. A. Grassucci, R. Jorgensen, G. R. Andersen, R. Beckmann, P. A. Penczek, J. P. Ballesta, and J. Frank.** 2004.

- Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *Embo J* **23**:1008-19.
172. **Spahn, C. M., E. Jan, A. Mulder, R. A. Grassucci, P. Sarnow, and J. Frank.** 2004. Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* **118**:465-75.
 173. **Spahn, C. M., and K. H. Nierhaus.** 1998. Models of the elongation cycle: an evaluation. *Biol Chem* **379**:753-72.
 174. **Spellman, P. T., G. Sherlock, M. Q. Zhang, V. R. Iyer, K. Anders, M. B. Eisen, P. O. Brown, D. Botstein, and B. Futcher.** 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**:3273-97.
 175. **Springer, M., D. D. Wykoff, N. Miller, and E. K. O'Shea.** 2003. Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. *PLoS Biol* **1**:E28.
 176. **Szyszkka, R.** 1999. Protein kinases phosphorylating acidic ribosomal proteins from yeast cells. *Folia Microbiol (Praha)* **44**:142-52.
 177. **Taylor, D. J., J. Nilsson, A. R. Merrill, G. R. Andersen, P. Nissen, and J. Frank.** 2007. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *Embo J* **26**:2421-31.
 178. **Tchorzewski, M., D. Krokowski, A. Boguszevska, A. Liljas, and N. Grankowski.** 2003. Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry* **42**:3399-408.
 179. **Tchorzewski, M., D. Krokowski, W. Rzeski, O. G. Issinger, and N. Grankowski.** 2003. The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:203-11.
 180. **Triana-Alonso, F. J., K. Chakraborty, and K. H. Nierhaus.** 1995. The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. *J Biol Chem* **270**:20473-8.
 181. **Troyanskaya, O., M. Cantor, G. Sherlock, P. Brown, T. Hastie, R. Tibshirani, D. Botstein, and R. B. Altman.** 2001. Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics* **17**:520-5.
 182. **Tusher, V. G., R. Tibshirani, and G. Chu.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5116-21.
 183. **Utsugi, T., A. Toh-e, and Y. Kikuchi.** 1995. A high dose of the STM1 gene suppresses the temperature sensitivity of the *tom1* and *htr1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1263**:285-8.
 184. **Vagabov, V. M., L. V. Trilisenko, and I. S. Kulaev.** 2000. Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* **65**:349-54.
 185. **Van Dyke, M. W., L. D. Nelson, R. G. Weilbaecher, and D. V. Mehta.** 2004. Stm1p, a G4 quadruplex and purine motif triplex nucleic acid-binding protein, interacts with ribosomes and subtelomeric Y' DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:24323-33.
 186. **Van Dyke, N., J. Baby, and M. W. Van Dyke.** 2006. Stm1p, a ribosome-associated protein, is important for protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under nutritional stress conditions. *J Mol Biol* **358**:1023-31.
 187. **Van Gelder, R. N., M. E. von Zastrow, A. Yool, W. C. Dement, J. D. Barchas, and J. H. Eberwine.** 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1663-7.
 188. **Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0034.
 189. **Venter, U., and W. Horz.** 1989. The acid phosphatase genes PHO10 and PHO11 in *S. cerevisiae* are located at the telomeres of chromosomes VIII and I. *Nucleic Acids Res* **17**:1353-69.

190. **Vilela, C., and J. E. McCarthy.** 2003. Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Mol Microbiol* **49**:859-67.
191. **Vilella, M. D., M. Remacha, B. L. Ortiz, E. Mendez, and J. P. Ballesta.** 1991. Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies. Proteins L44/L45 and L44' have different functional roles. *Eur J Biochem* **196**:407-14.
192. **Wang, X., L. E. Campbell, C. M. Miller, and C. G. Proud.** 1998. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem J* **334** (Pt 1):261-7.
193. **Warner, J. R., P. M. Knopf, and A. Rich.** 1963. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**:122-9.
194. **Welch, E. M., W. Wang, and S. W. Peltz.** 2000. Translational Termination: It's Not the End of the Story, p. 467-502. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational Control of Gene Expression*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
195. **Westermann, B., and W. Neupert.** 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:1421-7.
196. **Wilson, D. N., and K. H. Nierhaus.** 2006. The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* **63**:2725-37.
197. **Wintermeyer, W., F. Peske, M. Beringer, K. B. Gromadski, A. Savelsbergh, and M. V. Rodnina.** 2004. Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. *Biochem Soc Trans* **32**:733-7.
198. **Wissing, S., P. Ludovico, E. Herker, S. Buttner, S. M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real, K. U. Frohlich, J. Manns, C. Cande, S. J. Sigrist, G. Kroemer, and F. Madeo.** 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **166**:969-74.
199. **Wolfinger, R. D., G. Gibson, E. D. Wolfinger, L. Bennett, H. Hamadeh, P. Bushel, C. Afshari, and R. S. Paules.** 2001. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J Comput Biol* **8**:625-37.
200. **Woolford, J. L., and J. R. Warner.** 1991. The Ribosome and Its Synthesis, p. 587-626. *In* J. R. Broach, J. R. Pringle, and E. W. Jones (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
201. **Wykoff, D. D., and E. K. O'Shea.** 2001. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**:1491-9.
202. **Yang, I. V., E. Chen, J. P. Hasseman, W. Liang, B. C. Frank, S. Wang, V. Sharov, A. I. Saeed, J. White, J. Li, N. H. Lee, T. J. Yeatman, and J. Quackenbush.** 2002. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* **3**:research0062.
203. **Yang, Y. H., M. J. Buckley, and T. P. Speed.** 2001. Analysis of cDNA microarray images. *Brief Bioinform* **2**:341-9.
204. **Yang, Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T. P. Speed.** 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**:e15.
205. **Zambrano, R., E. Briones, M. Remacha, and J. P. Ballesta.** 1997. Phosphorylation of the acidic ribosomal P proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: a reappraisal. *Biochemistry* **36**:14439-46.
206. **Zampieri, S., W. Degen, A. Ghiradello, A. Doria, and W. J. van Venrooij.** 2001. Dephosphorylation of autoantigenic ribosomal P proteins during Fas-L induced apoptosis: a possible trigger for the development of the autoimmune response in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **60**:72-6.
207. **Zanelli, C. F., A. L. Maragno, A. P. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi, C. A. Mestriner, W. R. Lustri, and S. R. Valentini.** 2006. eIF5A binds to translational

- machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **348**:1358-66.
208. **Zinker, S., and J. R. Warner.** 1976. The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J Biol Chem* **251**:1799-807.
209. **Zuker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**:3406-15.
210. **Zurdo, J., J. M. Sanz, C. Gonzalez, M. Rico, and J. P. Ballesta.** 1997. The exchangeable yeast ribosomal acidic protein YP2beta shows characteristics of a partly folded state under physiological conditions. *Biochemistry* **36**:9625-35.

VIII. Abreviaturas.

Reg. exp. gen. med. x tallo rib. S. cerevisiae.

A_x : Absorbancia a una longitud de onda de X nm.
KAc: Acetato potásico.
AcNa: Acetato sódico.
APS: Persulfato amónico.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
cDNA: ADN complementario.
RNA: Ácido ribonucleico.
aRNA: ARN amplificado.
rRNA: ARN ribosómico.
mRNA: ARN mensajero.
 β ME: β -Mercaptoetanol.
BSA: Albúmina de suero bovino.
Cy3, Cyanine-3: Cy3-mono NHS éster.
Cy3-AP3-dUTP: 5-Amino-propargil-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato acoplado a Cy3.
Cy5, Cyanine-5: Cy5-mono NHS éster.
Cy5-AP3-dUTP: 5-Amino-propargil-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato acoplado a Cy5.
DEPC: Dietilpirocarbonato.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
 $D.O._x$: Densidad óptica medida a X nm.
DTT: Ditiotreitól.
EDTA: Etilén diamino tetracético.
FOI: Frecuencia de Incorporación de Oligonucleótidos.
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperzina-1-etanosulfónico.
IAA: Iodoacetamida.
I.E.F.: Isoelectroenfoque.
LOWESS: **L**ocal **w**eighted **s**catter plots **s**moother. Suavizador de gráficas de dispersión de puntos ponderado localmente.
ORF: **O**pen **R**eading **F**rame. Marco abierto de lectura.
PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction. Reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro.
Poli-A: Poli 2'-deoxiadenilato sódico.
PVDF: Difluoruro de polivinilideno.
RMA: **R**obust **M**ultiarray **A**verage. Media Robusta de Multiarrays.
SAM: S-Adenosilmetionina.
SDS: Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS.
SSC: Solución de citrato sódico 0,3M y cloruro sódico 3M.
TAE: Solución amortiguadora (o tampón) tris-acético Na_4 -EDTA
TBS: Tampón Tris salino.
TCA: Ácido tricloroacético.
TEMED: N,N,N',N', tetrametilén-metilén-diamina.
Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano.
U.A.: Unidades de absorbancia.
UTR: **U**n-**T**ranslated **R**egion. Región No Traducida.
VHr: Voltios hora.

IX. Apéndice.

*No guardes en la tesis lo que cabe en un apéndice.
Albert Einstein, adaptación*





IX. Apéndice.

*No guardes en la tesis lo que cabe en un apéndice.
Albert Einstein, adaptación.*



*Regulación de la expresión génica mediada por el tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*.*

Tabla A.1. Resultados del análisis de transcriptoma de D4567/W303 hibridado en microarrays de oligonucleótidos YG1.1. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

Orf	LogT	zs	Description
Q0070	5,3	10,7	Endonuclease I-SceIV, involved in intron mobility; encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YFL014W	2,4	5,4	Plasma membrane localized protein that protects membranes from dessication; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YCL021W-A	2,3	6,4	---
YER053C-A	2,2	5,0	---
Q0110	1,9	3,8	Mitochondrial mRNA maturase with a role in splicing, encoded by both exon and intron sequences of partially processed COB mRNA
YLR327C	1,7	4,6	Hypothetical ORF
YCL064C	1,6	4,1	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YLR247C	1,6	4,1	---
YCL017C	1,5	3,6	Required for the post-transcriptional thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs, also functions in mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis; NifS-like protein
YLR278C	1,5	3,9	---
YLR263W	1,5	3,0	Protein involved in chromosome segregation during the first meiotic division; component of the axial elements of the synaptonemal complex; interacts with Hop1p; required for wild-type levels of Mek1p kinase activity
YMR095C	1,5	3,4	Protein of unconfirmed function, involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
YLR262C-A	1,5	3,8	Similar to <i>C. elegans</i> protein
YDR019C	1,5	3,6	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
YIR039C	1,4	3,5	Putative GPI-anchored aspartic protease
YLR259C	1,4	3,2	Tetradecameric mitochondrial chaperonin required for ATP-dependent folding of precursor polypeptides and complex assembly; prevents aggregation and mediates protein refolding after heat shock; role in mtDNA transmission; similarity to groEL
YLR309C	1,3	3,4	Protein involved in vesicular transport, mediates transport between an endosomal compartment and the Golgi, contains a Golgi-localization (GRIP) domain that interacts with activated Arl1p-GTP to localize Imh1p to the Golgi
YLR258W	1,3	3,4	Glycogen synthase, similar to Gsy1p; expression induced by glucose limitation, nitrogen starvation, heat shock, and stationary phase; activity regulated by cAMP-dependent, Snf1p and Pho85p kinases as well as by the Gac1p-Glc7p phosphatase
YKR022C	1,3	2,8	---
YLR240W	1,3	3,4	phosphatidylinositol 3-kinase
YLR310C	1,3	3,4	Membrane bound guanine nucleotide exchange factor (GEF or GDP-release factor); indirectly regulates adenylate cyclase through activation of Ras1p and Ras2p by stimulating the exchange of GDP for GTP; required for progression through G1
YLR304C	1,3	3,2	Mitochondrial aconitase, required for the tricarboxylic acid (TCA) cycle; mutation leads to glutamate auxotrophy
YKL163W	1,3	3,4	Protein containing tandem internal repeats
YLR287C-A	1,3	3,3	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps30Bp and has similarity to rat S30 ribosomal protein
YLR294C	1,3	3,0	---
YBR085C-A	1,2	2,9	---
YER053C	1,2	3,3	Mitochondrial phosphate carrier, imports inorganic phosphate into mitochondria; functionally redundant with Mir1p but less abundant than Mir1p under normal conditions; expression is induced at high temperature
YGR142W	1,2	3,3	Cytosolic coiled-coil protein that modulates arginine uptake, interacts with Rbh1p, possible role in mediating pH homeostasis between the vacuole and plasma membrane H(+)-ATPase, may have a role in intracellular protein trafficking
YNL036W	1,2	2,9	Carbonic anhydrase; poorly transcribed under aerobic conditions and at an undetectable level under anaerobic conditions; involved in non-classical protein export pathway
YEL039C	1,2	3,2	Cytochrome c isoform 2, expressed under hypoxic conditions; electron carrier of the mitochondrial intermembrane space that transfers electrons from ubiquinone-cytochrome c oxidoreductase to cytochrome c oxidase during cellular respiration
YLR228C	1,2	3,2	Sterol regulatory element binding protein, regulates transcription of the sterol biosynthetic genes ERG2 and ERG3; member of the fungus-specific Zn[2]-Cys[6] binuclear cluster family of transcription factors; homologous to Upc2p
YOL052C-A	1,2	2,9	Multistress response protein, expression is activated by a variety of xenobiotic agents and environmental or physiological stresses
YLR289W	1,2	2,4	Mitochondrial GTPase of unknown function, similar to <i>E. coli</i> elongation factor-type GTP-binding protein LepA and to LK1236.1 from <i>Caenorhabditis elegans</i>
YMR096W	1,2	2,6	Snooze: stationary phase-induced gene family; involved in cellular response to nutrient limitation and growth arrest; encodes highly conserved 35 kDa protein that shows increased expression after entry into stationary phase
YLR295C	1,2	2,8	Subunit h of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis

YLR320W	1,1	2,4	---
YAL044C	1,1	2,7	H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
YKL026C	1,1	3,0	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced by glucose starvation that protects cells from phospholipid hydroperoxides and nonphospholipid peroxides during oxidative stress
YBR156C	1,1	2,3	Mitotic spindle protein involved in chromosome segregation.
YGL262W	1,1	3,4	---
YLR336C	1,1	2,9	Suppressor of Glycerol Defect; may be involved in high osmolarity signaling pathway
YHR087W	1,1	2,6	---
YOR298C-A	1,1	2,6	Transcriptional coactivator that bridges the DNA-binding region of Gcn4p and TATA-binding protein Spt15p; suppressor of frameshift mutations
YLR270W	1,1	2,7	Non-essential hydrolase involved in mRNA decapping, may function in a feedback mechanism to regulate deadenylation, contains pyrophosphatase activity and a HIT (histidine triad) motif; interacts with neutral trehalase Nth1p
YLR290C	1,1	2,8	---
YJR088C	1,1	2,9	---
YLR239C	1,1	2,7	Lipoyl ligase, involved in the modification of mitochondrial enzymes by the attachment of lipoic acid groups
YDR258C	1,1	2,7	Oligomeric mitochondrial matrix chaperone that cooperates with Ssc1p in mitochondrial thermotolerance after heat shock; prevents the aggregation of misfolded matrix proteins; component of the mitochondrial proteolysis system
YLR314C	1,1	2,7	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is required for cytokinesis; septins recruit proteins to the neck and can act as a barrier to diffusion at the membrane, and they comprise the 10nm filaments seen with EM
YLR284C	1,1	2,9	Peroxisomal delta3,delta2-enoyl-CoA isomerase, hexameric protein that converts 3-hexenoyl-CoA to trans-2-hexenoyl-CoA, essential for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids, oleate-induced
YLR252W	1,1	2,7	---
YLR281C	1,0	3,0	---
YDL174C	1,0	2,8	D-lactate dehydrogenase, oxidizes D-lactate to pyruvate, transcription is heme-dependent, repressed by glucose, and derepressed in ethanol or lactate; located in the mitochondrial inner membrane
YPR158W	1,0	2,7	---
YGL128C	1,0	2,6	Component of a complex containing Cef1p, putatively involved in pre-mRNA splicing; has similarity to E.coli DnaJ and other DnaJ-like proteins and to S. pombe Cwf23p
YDR461W	1,0	2,3	a-factor mating pheromone precursor
YHR024C	1,0	2,7	Larger subunit of the mitochondrial processing protease, essential processing enzyme that cleaves the N-terminal targeting sequences from mitochondrially imported proteins
YLR274W	1,0	2,5	Component of the hexameric MCM complex, which is important for priming origins of DNA replication in G1 and becomes an active ATP-dependent helicase that promotes DNA melting and elongation when activated by Cdc7p-Dbf4p in S-phase
YLR328W	1,0	2,6	NAD(+) salvage pathway; nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase
YIL080W	1,0	2,6	---
YLR244C	1,0	2,6	Methionine aminopeptidase, catalyzes the cotranslational removal of N-terminal methionine from nascent polypeptides; function is partially redundant with that of Map2p
YLR249W	1,0	2,6	stimulates the binding of aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) to ribosomes by releasing EF-1 alpha from the ribosomal complex; contains two ABC cassettes, and binds and hydrolyses ATP; EF-3 (translational elongation factor 3)
YLR436C	1,0	2,8	Non-essential protein of unknown function
YBR255W	1,0	2,7	---
YLR280C	1,0	2,6	---
YBR244W	1,0	2,3	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced by glucose starvation that protects cells from phospholipid hydroperoxides and nonphospholipid peroxides during oxidative stress
YPR122W	1,0	2,7	Haploid specific endoprotease that performs one of two N-terminal cleavages during maturation of a-factor mating pheromone; required for axial budding pattern of haploid cells
YJL108C	1,0	2,7	Pheromone-regulated protein, predicted to have 5 transmembrane segments
YKR102W	1,0	2,4	Lectin-like protein with similarity to Flo1p, thought to be involved in flocculation
YKL066W	1,0	2,5	---
YLR261C	1,0	2,2	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 98% of ORF overlaps the verified gene YPT6; deletion causes a vacuolar protein sorting defect
YLR268W	1,0	2,5	Identified in a screen for dense cells that accumulated invertase at the non-permissive temperature, SEC22 encodes a v-SNARE present on ER to Golgi vesicles and is involved in anterograde and retrograde transport between the ER and Golgi; Synaptobrevin (v-SNARE) homolog
YDR345C	-1,0	-2,0	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced in low or high glucose conditions
YEL045C	-1,0	-2,0	---
YCR062W	-1,0	-2,1	---
YBR078W	-1,0	-2,2	GPI-anchored protein of unknown function, has a possible role in apical bud growth; GPI-anchoring on the plasma membrane crucial to function; similar to Sps2p and Pst1p
YCL001W	-1,0	-2,1	Protein involved in retention of membrane proteins, including Sec12p, in the ER; localized to Golgi; functions as a retrieval receptor in returning membrane proteins to the ER
YOR087W	-1,0	-2,0	Vacuolar cation channel, mediates release of Ca(2+) from the vacuole in response to hyperosmotic shock

YGR028W	-1,0	-2,2	40 kDa putative membrane-spanning ATPase
YBL082C	-1,0	-2,1	Dolichol-P-Man dependent alpha(1-3) mannosyltransferase, involved in the synthesis of dolichol-linked oligosaccharide donor for N-linked glycosylation of proteins
YPR114W	-1,0	-2,1	---
YNR034W-A	-1,0	-2,1	---
YDR343C	-1,0	-2,0	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, nearly identical to Hxt7p, expressed at high basal levels relative to other HXTs, repression of expression by high glucose requires SNF3
YHR028C	-1,0	-2,0	Dipeptidyl aminopeptidase, synthesized as a glycosylated precursor; localizes to the vacuolar membrane; similar to Ste13p
YFL031W	-1,1	-2,3	bZIP transcription factor (ATF/CREB1 homolog) that regulates the unfolded-protein response, via UPRE binding, and membrane biogenesis; ER stress-induced splicing pathway utilizing Ire1p, Trl1p and Ada5p facilitates efficient Hac1p synthesis
YDR367W	-1,1	-2,1	---
YMR146C	-1,1	-2,2	Subunit of the core complex of translation initiation factor 3(eIF3), which is essential for translation
YLR214W	-1,1	-2,2	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low copper and iron levels
YNL141W	-1,1	-2,1	Adenine deaminase (adenine aminohydrolase), involved in purine salvage and nitrogen catabolism
YGL055W	-1,1	-2,2	Fatty acid desaturase, required for monounsaturated fatty acid synthesis and for normal distribution of mitochondria
YBR220C	-1,1	-2,1	---
YOR071C	-1,1	-2,2	---
YOR344C	-1,1	-2,3	may be involved in glycolytic gene expression; TYE7, a 33 kDa serine-rich protein, is a potential member of the basic region/helix-loop-helix/leucine-zipper protein family
YGL084C	-1,1	-2,3	Multimembrane-spanning protein and putative glycerol transporter that is essential for proton symport of glycerol; Gup2p homolog
YOR306C	-1,1	-2,3	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases, which are involved in transport of monocarboxylic acids across the plasma membrane; mutant is not deficient in monocarboxylate transport
YDR518W	-1,1	-2,2	Protein disulfide isomerase of the endoplasmic reticulum lumen, function overlaps with that of Pdi1p; may interact with nascent polypeptides in the ER
YFL044C	-1,1	-2,2	Yeast OTU Deubiquitinating enzyme 1
Q0160	-1,1	-2,2	I-SceI DNA endonuclease encoded by mitochondrial 21S rRNA gene intron
YBR027C	-1,1	-2,2	---
YPR124W	-1,1	-2,2	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, mediates nearly all copper uptake under low copper conditions; transcriptionally induced at low copper levels and degraded at high copper levels
YBR015C	-1,1	-2,3	Alpha-1,2-mannosyltransferase, responsible for addition of the first alpha-1,2-linked mannose to form the branches on the mannan backbone of oligosaccharides, localizes to an early Golgi compartment
YPL094C	-1,1	-2,3	membrane component of ER protein translocation apparatus
YIL088C	-1,2	-2,2	Putative transporter, member of a family of seven <i>S. cerevisiae</i> genes (AVT1-7) related to vesicular GABA-glycine transporters
YEL042W	-1,2	-2,2	Guanosine diphosphatase located in the Golgi, involved in the transport of GDP-mannose into the Golgi lumen by converting GDP to GMP after mannose is transferred its substrate
YBR042C	-1,2	-2,4	---
YGL027C	-1,2	-2,3	Processing alpha glucosidase I, involved in assembly of cell wall beta 1,6 glucan and asparagine-linked protein glycosylation; ER type II integral membrane N-glycoprotein; disruption leads to a K1 killer toxin-resistant phenotype
YLL028W	-1,2	-2,5	Proton-motive-force-dependent multidrug transporter of the major facilitator superfamily; able to transport eight different compounds, including polyamines, quinidine, cycloheximide, and nystatin; involved in excess spermidine detoxification
YMR058W	-1,2	-2,5	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and involved in mediating resistance to copper ion toxicity, belongs to class of integral membrane multicopper oxidases
YPR110C	-1,2	-2,4	RNA polymerase subunit, common to RNA polymerase I and III
YBR302C	-1,2	-2,5	Protein of unknown function, member of a family of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YML132W	-1,2	-2,4	Protein involved in salt resistance; interacts with sodium:hydrogen antiporter Nha1p; member of a family of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YML131W	-1,3	-2,5	---
YER001W	-1,3	-2,4	Alpha-1,3-mannosyltransferase, integral membrane glycoprotein of the Golgi complex, required for addition of alpha1,3-mannose linkages to N-linked and O-linked oligosaccharides, one of five <i>S. cerevisiae</i> proteins of the MNN1 family
YMR256C	-1,3	-2,6	Subunit VII of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain
YLR121C	-1,3	-2,3	Aspartic protease, attached to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor
YER091C	-1,3	-2,5	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase
YML122C	-1,3	-2,6	---
YNL217W	-1,3	-2,5	---
YHR092C	-1,3	-2,5	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose

YAL023C	-1,3	-2,7	Transfers mannosyl residues from dolichyl phosphate-D-mannose to seryl and threonyl residues in proteins; acts in complex with Pmt1p; dolichyl phosphate-D-mannose:protein O-D-mannosyltransferase
YMR011W	-1,3	-2,5	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
YMR202W	-1,3	-2,6	C-8 sterol isomerase, catalyzes the isomerization of the delta-8 double bond to the delta-7 position at an intermediate step in ergosterol biosynthesis
YNL322C	-1,3	-2,7	Cell wall glycoprotein involved in beta-glucan assembly; serves as a K1 killer toxin membrane receptor
YDL155W	-1,3	-2,7	Involved in mitotic induction and perhaps in DNA replication and spindle assembly; G(sub)2-specific B-type cyclin
YLR378C	-1,3	-2,8	membrane component of ER protein translocation apparatus
YBR283C	-1,3	-2,8	Sec61p homolog involved in co-translational pathway of protein transport
YNL134C	-1,3	-2,7	---
YHR029C	-1,4	-2,6	---
YGR125W	-1,4	-2,7	---
YML116W	-1,4	-2,7	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily, required for resistance to aminotriazole and 4-nitroquinoline-N-oxide
YOR375C	-1,5	-3,0	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase, synthesizes glutamate from ammonia and alpha-ketoglutarate; rate of alpha-ketoglutarate utilization differs from Gdh3p; expression regulated by nitrogen and carbon sources
YNL259C	-1,5	-3,1	Cytosolic copper metallochaperone that transports copper to the secretory vesicle copper transporter Ccc2p for eventual insertion into Fet3p, which is a multicopper oxidase required for high-affinity iron uptake
YLL060C	-1,5	-3,0	Glutathione S-transferase capable of homodimerization; functional overlap with Gtt2p, Grx1p, and Grx2p
YKL120W	-1,5	-3,0	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YDR481C	-1,5	-3,0	Repressible alkaline phosphatase, a glycoprotein localized to the vacuole; regulated by levels of inorganic phosphate and by a system consisting of Pho4p, Pho9p, Pho80p, Pho81p and Pho85p; dephosphorylates phosphotyrosyl peptides
YGR121C	-1,5	-3,0	Ammonia permease; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH4+)
YKR093W	-1,5	-3,0	Functions in transport of small peptides into the cell; Peptide transporter
YCR034W	-1,5	-3,0	Fatty acid elongase, involved in sphingolipid biosynthesis; acts on fatty acids of up to 24 carbons in length; mutations have regulatory effects on 1,3-beta-glucan synthase, vacuolar ATPase, and the secretory pathway
YJL012C-A	-1,5	-3,0	---
YER060W-A	-1,5	-3,0	Putative purine-cytosine permease, very similar to Fcy2p but cannot substitute for its function
YLR303W	-1,5	-3,0	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YNL156C	-1,6	-3,1	Protein of unknown function, potential homolog of mammalian Insig 1
YNL070W	-1,6	-3,3	Involved in mitochondrial protein import; translocase of the outer mito. membrane
YGL009C	-1,6	-3,1	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YMR307W	-1,6	-3,1	Beta-1,3-glucanosyltransferase, required for cell wall assembly; localizes to the cell surface via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor
YCL025C	-1,6	-3,1	Low-affinity amino acid permease with broad substrate range, involved in uptake of asparagine, glutamine, and other amino acids; expression is regulated by the SPS plasma membrane amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)
YKL001C	-1,6	-3,4	Adenylylsulfate kinase, required for sulfate assimilation and involved in methionine metabolism
YFL004W	-1,6	-3,3	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YMR149W	-1,7	-3,5	oligosaccharyl transferase glycoprotein complex, delta subunit
YER056C	-1,7	-3,3	Purine-cytosine permease, mediates purine (adenine, guanine, and hypoxanthine) and cytosine accumulation
YBR008C	-1,7	-3,3	Plasma membrane multidrug transporter, member of the major facilitator superfamily; involved in efflux of fluconazole, diazaborine, benomyl, methotrexate, and other drugs
YMR215W	-1,7	-3,4	Putative 1,3-beta-glucanosyltransferase, has similarity to Gas1p; localizes to the cell wall
YFL056C	-1,7	-3,5	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YNL038W	-1,7	-3,2	Protein involved in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol (GlcNAc-PI), the first intermediate in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors; homologous to the human PIG-H protein
YJR001W	-1,7	-3,4	Vacuolar transporter, imports large neutral amino acids into the vacuole; member of a family of seven S. cerevisiae genes (AVT1-7) related to vesicular GABA-glycine transporters
YER072W	-1,7	-3,6	Protein involved in vacuolar maintenance
YJL012C	-1,8	-3,6	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YPL274W	-1,8	-3,5	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YER037W	-1,8	-3,7	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
Q0085	-1,9	-3,9	Mitochondrially encoded subunit 6 of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YGL255W	-2,0	-4,1	High-affinity zinc transporter of the plasma membrane, responsible for the majority of zinc uptake; transcription is induced under low-zinc conditions by the Zap1p transcription factor
YJL212C	-2,0	-4,0	Plasma membrane transporter that transports tetra- and pentapeptides and glutathione;

YNL327W	-2,1	-3,8	member of the OPT family Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall endoglucanase required for proper cell separation after cytokinesis, expression is activated by Swi5p and tightly regulated in a cell cycle-dependent manner
YMR006C	-2,1	-4,2	Phospholipase B 2; lysophospholipase/phospholipase B
YPL019C	-2,1	-4,3	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
Q0080	-2,2	-4,5	Subunit 8 of the F0 sector of mitochondrial inner membrane F1-F0 ATP synthase, encoded on the mitochondrial genome
YFL021W	-2,2	-4,6	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression, member of the GATA family of DNA binding proteins; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p
YGL089C	-2,2	-4,7	alpha mating factor
YGL161C	-2,2	-4,4	Protein that interacts with Rab GTPases; computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a possible role in vesicle-mediated transport
Q0105	-2,3	-4,7	Cytochrome b
YLR083C	-2,5	-4,5	Protein whose 24kDa cleavage product is found in endosome-enriched membrane fractions, predicted to be a transmembrane protein
YCR098C	-2,5	-5,1	Plasma membrane permease, mediates uptake of the phosphatidylinositol metabolite glycerophosphoinositol as a source of the nutrients inositol and phosphate; expression and transport rate are regulated by phosphate and inositol availability
YHR136C	-2,6	-5,3	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors, overproduction suppresses a plc1 null mutation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YMR292W	-2,6	-5,0	Golgi Transport; membrane protein
YDL130W	-2,7	-5,9	Ribosomal protein P1 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YNL142W	-2,8	-5,8	Ammonia permease; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH ₄ ⁺)
YKR039W	-3,0	-5,5	General amino acid permease; localization to the plasma membrane is regulated by nitrogen source
YNL130C	-3,0	-6,0	Cholinephosphotransferase, required for phosphatidylcholine biosynthesis and for inositol-dependent regulation of EPT1 transcription
YDR382W	-3,1	-6,8	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YHR215W	-3,1	-6,5	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YAR071W	-3,2	-6,7	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YML123C	-3,3	-6,6	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YOL039W	-4,1	-8,7	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YDL081C	-4,1	-9,0	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component

Tabla A.2. Resultados del análisis de traductoma de D4567/W303 hibridado en microarrays de oligonucleótidos YG1.1. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

Orf	LogT	zs	Description
YKL221W	1,7	3,6	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases, which are involved in transport of monocarboxylic acids across the plasma membrane; mutant is not deficient in monocarboxylate transport
YFL014W	1,6	5,4	Plasma membrane localized protein that protects membranes from dessication; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YCL021W-A	1,5	4,4	---
YAR042W	1,5	3,0	Similar to mammalian oxysterol-binding protein; ankyrin repeat
YFL015C	1,3	2,7	---
YMR201C	1,3	2,9	Protein that recognizes and binds damaged DNA during nucleotide excision repair; subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 1 (NEF1); contains zinc finger motif; homolog of human XPA protein
YLR259C	1,2	4,2	Tetradecameric mitochondrial chaperonin required for ATP-dependent folding of precursor polypeptides and complex assembly; prevents aggregation and mediates protein refolding after

			heat shock; role in mtDNA transmission; similarity to groEL
YPL080C	1,2	2,8	---
Q0070	1,1	2,6	Endonuclease I-SceIV, involved in intron mobility; encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YLR281C	1,1	4,2	---
YER054C	1,1	2,7	Putative regulatory subunit of the protein phosphatase Glc7p, proposed to be involved in glycogen metabolism; contains a conserved motif (GVNK motif) that is also found in Gac1p, Pig1p, and Pig2p
YNR074C	1,1	4,1	---
YBR152W	1,1	2,2	Suppressor of Pre-mRNA Processing mutant; U4/U6.U5-associated snRNP protein; contains a PEST proteolysis motif
YLR304C	1,1	3,1	Mitochondrial aconitase, required for the tricarboxylic acid (TCA) cycle; mutation leads to glutamate auxotrophy
YML100W-A	1,1	2,5	---
YPL060C-A	1,1	2,5	---
YGL262W	1,1	2,2	---
YCL064C	1,1	5,0	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YGL212W	1,0	2,3	Regulator of vacuolar morphogenesis; hydrophilic protein, heptad repeat motif
YOR356W	1,0	2,4	---
YLR327C	1,0	3,9	Hypothetical ORF
YOR202W	1,0	4,5	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YMR103C	1,0	4,0	---
YNL083W	1,0	2,0	Probable transporter, member of the Ca ²⁺ -binding subfamily of the mitochondrial carrier family, with two EF-hand motifs; Pet9p and Sal1p have an overlapping function critical for viability; polymorphic in different <i>S. cerevisiae</i> strains
YNL317W	-1,0	-3,6	Integral subunit of the pre-mRNA cleavage and polyadenylation factor (CPF) complex; plays an essential role in mRNA 3'-end formation by bridging different processing factors and thereby promoting the assembly of the processing complex
YER060W-A	-1,0	-2,6	Putative purine-cytosine permease, very similar to Fcy2p but cannot substitute for its function
Q0065	-1,0	-2,0	Endonuclease I-SceII, encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene; intron is normally spliced by the Bl4p maturase but Al4p can mutate to acquire the same maturase activity
YBR078W	-1,0	-2,6	GPI-anchored protein of unknown function, has a possible role in apical bud growth; GPI-anchoring on the plasma membrane crucial to function; similar to Sps2p and Pst1p
YFL056C	-1,0	-3,3	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YJL012C-A	-1,0	-3,6	---
YKL001C	-1,0	-4,1	Adenylylsulfate kinase, required for sulfate assimilation and involved in methionine metabolism
YFL021W	-1,0	-2,9	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression, member of the GATA family of DNA binding proteins; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p
YDL235C	-1,0	-2,7	Phosphorelay intermediate protein, phosphorylated by the plasma membrane sensor Sln1p in response to osmotic stress and then in turn phosphorylates the response regulators Ssk1p in the cytosol and Skn7p in the nucleus
YFR038W	-1,0	-2,4	---
YNL321W	-1,0	-2,2	---
YDR382W	-1,0	-3,7	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YER091C	-1,0	-3,0	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase
YBR015C	-1,0	-2,5	Alpha-1,2-mannosyltransferase, responsible for addition of the first alpha-1,2-linked mannose to form the branches on the mannan backbone of oligosaccharides, localizes to an early Golgi compartment
YMR110C	-1,0	-2,6	---
YML131W	-1,1	-3,4	---
YPR110C	-1,1	-3,2	RNA polymerase subunit, common to RNA polymerase I and III
YER073W	-1,1	-3,8	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase that is activated by K ⁺ and utilizes NADP ⁺ as the preferred coenzyme
YGL084C	-1,1	-2,1	Multimembrane-spanning protein and putative glycerol transporter that is essential for proton symport of glycerol; Gup2p homolog
YHL003C	-1,1	-2,9	Ceramide synthase component, involved in synthesis of ceramide from C26(acyl)-coenzyme A and dihydrosphingosine or phytosphingosine, functionally equivalent to Lac1p
YDR345C	-1,1	-2,8	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced in low or high glucose conditions
YGR284C	-1,2	-2,2	Protein localized to COPII-coated vesicles, involved in vesicle formation and incorporation of specific secretory cargo
YDL180W	-1,2	-3,0	---

YHR215W	-1,2	-4,7	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YER037W	-1,2	-4,2	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YER072W	-1,2	-3,7	Protein involved in vacuolar maintenance
YKL120W	-1,2	-4,1	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YJR001W	-1,2	-2,3	Vacuolar transporter, imports large neutral amino acids into the vacuole; member of a family of seven <i>S. cerevisiae</i> genes (AVT1-7) related to vesicular GABA-glycine transporters
YLL060C	-1,2	-4,1	Glutathione S-transferase capable of homodimerization; functional overlap with Gtt2p, Grx1p, and Grx2p
YOL151W	-1,2	-4,4	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YNR077C	-1,2	-2,1	---
YGL161C	-1,2	-2,9	Protein that interacts with Rab GTPases; computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a possible role in vesicle-mediated transport
YNR034W-A	-1,3	-3,3	---
YNL134C	-1,3	-4,4	---
YDL179W	-1,3	-3,0	Cyclin, forms a functional kinase complex with Pho85p cyclin-dependent kinase (Cdk), expressed in late M/early G1 phase, activated by Swi5p
YLR189C	-1,3	-2,2	Udp-glycosyltransferase; UDP-glucose:sterol glucosyltransferase
YER087C-A	-1,3	-4,0	---
YHR068W	-1,3	-4,4	Deoxyhypusine synthase, catalyzes formation of deoxyhypusine, the first step in hypusine biosynthesis; triggers posttranslational hypusination of translation elongation factor eIF-5A and regulates its intracellular levels; tetrameric
YCR024C-A	-1,3	-4,5	May regulate plasma membrane H(+)-ATPase; Proteolipid associated with plasma membrane H(+)-ATPase (Pma1p)
YPL188W	-1,3	-2,7	Mitochondrial NADH kinase, phosphorylates NADH; also phosphorylates NAD(+) with lower specificity; required for the response to oxidative stress
YOR375C	-1,3	-3,9	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase, synthesizes glutamate from ammonia and alpha-ketoglutarate; rate of alpha-ketoglutarate utilization differs from Gdh3p; expression regulated by nitrogen and carbon sources
YKR028W	-1,3	-2,3	Protein that forms a complex with the Sit4p protein phosphatase and is required for its function; member of a family of similar proteins including Sap4p, Sap155p, and Sap185p
YJL212C	-1,3	-2,6	Plasma membrane transporter that transports tetra- and pentapeptides and glutathione; member of the OPT family
YFL060C	-1,4	-2,2	Protein of unknown function, nearly identical to Sno2p; expression is induced before the diauxic shift and also in the absence of thiamin
YBR036C	-1,4	-2,8	Endoplasmic reticulum membrane protein, required for mannosylation of inositolphosphorylceramide and for growth at high calcium concentrations
YDL130W	-1,4	-4,2	Ribosomal protein P1 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YLR303W	-1,4	-5,4	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YPR147C	-1,4	-2,0	---
YDR492W	-1,4	-2,4	Membrane protein involved in zinc metabolism, member of the four-protein IZH family, direct target of the Zap1p transcription factor, expression induced by zinc deficiency and fatty acids, deletion increases sensitivity to elevated zinc
YDR398W	-1,5	-2,5	Nucleolar protein, component of the small subunit (SSU) processome containing the U3 snoRNA that is involved in processing of pre-18S rRNA
YCR034W	-1,5	-3,5	Fatty acid elongase, involved in sphingolipid biosynthesis; acts on fatty acids of up to 24 carbons in length; mutations have regulatory effects on 1,3-beta-glucan synthase, vacuolar ATPase, and the secretory pathway
YBR027C	-1,5	-2,5	---
YFR039C	-1,5	-2,5	---
YNL065W	-1,5	-2,5	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily that confers resistance to short-chain monocarboxylic acids and quinidine
YJR023C	-1,5	-2,2	---
YPL019C	-1,5	-5,5	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YAL023C	-1,6	-3,2	Transfers mannosyl residues from dolichyl phosphate-D-mannose to seryl and threonyl residues in proteins; acts in complex with Pmt1p; dolichyl phosphate-D-mannose:protein O-D-mannosyltransferase
YDL155W	-1,6	-5,5	Involved in mitotic induction and perhaps in DNA replication and spindle assembly; G(sub)2-specific B-type cyclin
YGL089C	-1,6	-5,3	alpha mating factor
YDR100W	-1,6	-2,7	Tlg2-Vesicle Protein of 15 kDa; integral membrane vesicle protein
YOR327C	-1,6	-2,3	mediate the targeting and transport of secretory proteins; vesicle-associated membrane protein (synaptobrevin) homolog
YDR508C	-1,6	-4,5	high-affinity glutamine permease
YER119C	-1,6	-4,6	Vacuolar transporter, exports aspartate and glutamate from the vacuole; member of a family of seven <i>S. cerevisiae</i> genes (AVT1-7) related to vesicular GABA-glycine transporters
YGL009C	-1,6	-6,3	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway

YDR281C	-1,6	-3,4	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels
YNL156C	-1,7	-3,9	Protein of unknown function, potential homolog of mammalian Insig 1
YNL070W	-1,7	-4,7	Involved in mitochondrial protein import; translocase of the outer mito. membrane
YKR039W	-1,7	-3,5	General amino acid permease; localization to the plasma membrane is regulated by nitrogen source
YBL042C	-1,7	-2,1	High affinity uridine permease, localized to the plasma membrane; not involved in uracil transport
YLR413W	-1,7	-5,6	---
YKL219W	-1,7	-2,4	Protein of unknown function, member of a family of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YMR215W	-1,7	-3,0	Putative 1,3-beta-glucanosyltransferase, has similarity to Gas1p; localizes to the cell wall
YGL065C	-1,7	-3,0	Mannosyltransferase, mannosylates Man2GlcNAc2-PP-Dol to form Man3GlcNAc2-PP-Dol, which is a precursor required for asparagine-linked protein glycosylation
YDR338C	-1,8	-2,5	---
YAR071W	-1,8	-6,6	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YBR247C	-1,8	-3,0	Protein associated with U3 and U14 snoRNAs, required for pre-rRNA processing and 40S ribosomal subunit synthesis; localized in the nucleus and concentrated in the nucleolus
YHR002W	-1,8	-2,2	Mitochondrial carrier protein involved in the accumulation of CoA in the mitochondrial matrix; homolog of human Graves disease protein; does not encode an isozyme of Leu4p, as first hypothesized
YBR287W	-1,8	-3,0	---
YPR183W	-1,9	-6,0	Dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) synthase of the ER membrane, catalyzes the formation of Dol-P-Man from Dol-P and GDP-Man; required for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and protein glycosylation
YGR199W	-1,9	-3,7	Transfers mannose residues from dolichyl phosphate-D-mannose to specific serine/threonine residues of proteins in the secretory pathway; dolichyl phosphate-D-mannose:protein O-D-mannosyltransferase
YFL004W	-1,9	-5,4	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YDR525W-A	-1,9	-5,3	Protein of unknown function, has similarity to Pmp3p, which is involved in cation transport; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YLR169W	-1,9	-2,2	---
YHR136C	-2,0	-6,8	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors, overproduction suppresses a plc1 null mutation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
Q0085	-2,0	-6,1	Mitochondrially encoded subunit 6 of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YGR038W	-2,0	-3,2	Evolutionarily conserved protein with similarity to Orm2p, required for resistance to agents that induce the unfolded protein response; human ortholog is located in the endoplasmic reticulum
YDR033W	-2,0	-7,0	Protein that localizes primarily to the plasma membrane, also found at the nuclear envelope; has similarity to Hsp30p and Yro2p, which are induced during heat shock
YDR367W	-2,0	-4,9	---
YOR394W	-2,0	-3,5	---
YDR342C	-2,1	-2,6	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, nearly identical to Hxt6p, expressed at high basal levels relative to other HXTs, expression repressed by high glucose levels
YNL268W	-2,1	-3,5	Lysine permease; one of three amino acid permeases (Alp1p, Can1p, Lyp1p) responsible for uptake of cationic amino acids
YKL083W	-2,2	-2,8	---
YML123C	-2,2	-5,3	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YDR089W	-2,2	-3,3	---
YPR126C	-2,2	-3,9	---
YCR043C	-2,2	-4,8	---
YOR103C	-2,4	-4,0	Epsilon subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the ER lumen, which catalyzes asparagine-linked glycosylation of newly synthesized proteins
YOR365C	-2,4	-3,3	---
YMR292W	-2,5	-5,2	Golgi Transport; membrane protein
YDR504C	-2,5	-4,3	Protein required for survival at high temperature during stationary phase; not required for growth on nonfermentable carbon sources
YDR343C	-2,6	-7,3	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, nearly identical to Hxt7p, expressed at high basal levels relative to other HXTs, repression of expression by high glucose requires SNF3
Q0080	-2,8	-4,8	Subunit 8 of the F0 sector of mitochondrial inner membrane F1-F0 ATP synthase, encoded on the mitochondrial genome
YDL081C	-2,9	-10,0	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YNL130C	-3,1	-3,9	Cholinephosphotransferase, required for phosphatidylcholine biosynthesis and for inositol-dependent regulation of EPT1 transcription

YMR294W-A	-3,2	-5,4	---
YOL039W	-3,7	-11,4	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm

Tabla A.3. Resultados del análisis de transcriptoma de D4567/W303 hibridado en microarrays de DNA Y64.4K. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

ORF	LogT	zs	Description
YBL030C	2,64	6,0	Major ADP/ATP carrier of the mitochondrial inner membrane, exchanges cytosolic ADP for mitochondrially synthesized ATP; Pet9p and Sal1p have an overlapping function critical for viability
YBR295W	2,62	6,3	P-type metal-transporting ATPase with a role in copper and iron homeostasis; R970G-substitution in the C-terminal region confers cadmium resistance
YDL161W	2,37	7,5	Epsin-like protein involved in endocytosis and actin patch assembly and functionally redundant with Ent2p; binds clathrin via a clathrin-binding domain motif at C-terminus
YLR411W	2,22	6,5	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, acts as a trimer; gene is disrupted by a Ty2 transposon insertion in many laboratory strains of <i>S. cerevisiae</i>
YNR074C	1,95	7,0	---
YDR018C	1,85	5,5	---
YOR318C	1,67	4,2	---
YFL014W	1,56	5,9	Plasma membrane localized protein that protects membranes from dessication; induced by heat shock, oxidative stress, osmotic stress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YOL101C	1,54	4,8	Membrane protein involved in zinc metabolism, member of the four-protein IZH family, expression induced by fatty acids and altered zinc levels; deletion reduces sensitivity to excess zinc; possible role in sterol metabolism
YLR309C	1,38	5,0	Protein involved in vesicular transport, mediates transport between an endosomal compartment and the Golgi, contains a Golgi-localization (GRIP) domain that interacts with activated Arl1p-GTP to localize Imh1p to the Golgi
YBL085W	1,37	5,0	Protein implicated in polar growth, functionally redundant with Boi2p; interacts with bud-emergence protein Bem1p; contains an SH3 (src homology 3) domain and a PH (pleckstrin homology) domain
YLR242C	1,36	3,6	Protein with similarity to Nup120p and <i>C.elegans</i> R05H5.5 protein
YCL051W	1,34	3,4	Protein involved in control of cell wall structure and stress response; inhibits Cbk1p protein kinase activity; overproduction confers resistance to cell-wall degrading enzymes
YER053C	1,29	5,4	Mitochondrial phosphate carrier, imports inorganic phosphate into mitochondria; functionally redundant with Mir1p but less abundant than Mir1p under normal conditions; expression is induced at high temperature
YFR035C	1,25	3,4	---
YAL002W	1,23	3,8	involved in vacuolar protein sorting; required for localization and trafficking of the CPY sorting receptor; Vps8p is a membrane-associated hydrophilic protein which contains a C-terminal cysteine-rich region that conforms to the H2 variant of the RING finger Zn ²⁺ binding motif.
YGL162W	1,21	3,1	Involved in sterol uptake; hypoxic gene family involved in sterol transport
YCL064C	1,21	4,2	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YLR314C	1,20	2,9	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is required for cytokinesis; septins recruit proteins to the neck and can act as a barrier to diffusion at the membrane, and they comprise the 10nm filaments seen with EM
YLR270W	1,19	4,8	Non-essential hydrolase involved in mRNA decapping, may function in a feedback mechanism to regulate deadenylation, contains pyrophosphatase activity and a HIT (histidine triad) motif; interacts with neutral trehalase Nth1p
YAL044C	1,18	5,1	H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
YLR325C	1,18	2,7	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, has similarity to rat L38 ribosomal protein
YLR259C	1,17	2,6	Tetradecameric mitochondrial chaperonin required for ATP-dependent folding of precursor polypeptides and complex assembly; prevents aggregation and mediates protein refolding after heat shock; role in mtDNA transmission; similarity to groEL
YLR313C	1,16	3,5	Protein involved in shmoo formation and required for bipolar bud site selection, homologous to Spa2p, localizes to sites of polarized growth
YNL235C	1,14	2,9	---
YEL021W	1,13	4,0	orotidine-5'-phosphate decarboxylase
YLR238W	1,13	2,6	Protein involved in G1 cell cycle arrest in response to pheromone, in a pathway different from the Far1p-dependent pathway; interacts with Far3p, Far7p, Far8p, Far9p, and Far11p; potential Cdc28p substrate
YOR202W	1,12	3,9	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YMR196W	1,11	4,0	---
YDL099W	1,10	2,9	---
YLR304C	1,10	2,5	Mitochondrial aconitase, required for the tricarboxylic acid (TCA) cycle; mutation leads to glutamate auxotrophy

YLR276C	1,09	3,9	ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in biogenesis of the 60S ribosomal subunit
YLR262C	1,07	4,4	Ras-like GTP binding protein involved in the secretory pathway, required for fusion of endosome-derived vesicles with the late Golgi; has similarity to the human GTPase, Rab6
YOR204W	1,07	2,7	ATP-dependent DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)-box RNA helicase, required for translation initiation of all yeast mRNAs
YLR249W	1,07	2,5	stimulates the binding of aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) to ribosomes by releasing EF-1 alpha from the ribosomal complex; contains two ABC cassettes, and binds and hydrolyses ATP; EF-3 (translational elongation factor 3)
YLR261C	1,07	4,7	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 98% of ORF overlaps the verified gene YPT6; deletion causes a vacuolar protein sorting defect
YLR286C	1,06	2,4	Endochitinase, required for cell separation after mitosis; transcriptional activation during late G and early M cell cycle phases is mediated by transcription factor Ace2p
YLR274W	1,06	4,1	Component of the hexameric MCM complex, which is important for priming origins of DNA replication in G1 and becomes an active ATP-dependent helicase that promotes DNA melting and elongation when activated by Cdc7p-Dbf4p in S-phase
YLR258W	1,06	4,2	Glycogen synthase, similar to Gsy1p; expression induced by glucose limitation, nitrogen starvation, heat shock, and stationary phase; activity regulated by cAMP-dependent, Snf1p and Pho85p kinases as well as by the Gac1p-Glc7p phosphatase
YLR316C	1,05	4,3	tRNA-specific adenosine-34 deaminase subunit Tad3p
YLR300W	1,05	2,3	Major exo-1,3-beta-glucanase of the cell wall, involved in cell wall beta-glucan assembly; exists as three differentially glycosylated isoenzymes
YOR190W	1,04	4,0	Sporulation regulated genes; sporulation-specific exo-1,3-beta-glucanase
YGL250W	1,01	2,7	---
YLR289W	1,01	3,4	Mitochondrial GTPase of unknown function, similar to E. coli elongation factor-type GTP-binding protein LepA and to LK1236.1 from <i>Caenorhabditis elegans</i>
YLR237W	1,00	2,9	Plasma membrane transporter responsible for the uptake of thiamine, member of the major facilitator superfamily of transporters; mutation of human ortholog causes thiamine-responsive megaloblastic anemia
YDR277C	-1,00	-2,0	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway, required for repression of transcription by Rgt1p; interacts with Rgt1p and the Snf3p and Rgt2p glucose sensors; phosphorylated by Yck1p, triggering Mth1p degradation
YIL074C	-1,00	-4,5	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser3p
YDL114W	-1,01	-2,1	---
YLR460C	-1,02	-4,1	---
YPL274W	-1,02	-3,1	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YFL057C	-1,04	-4,3	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase; mutational analysis has not yet revealed a physiological role
YMR173W	-1,06	-3,3	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; contains multiple repeats of the amino acid sequence NNND SYGS
YFL004W	-1,07	-4,3	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YBR018C	-1,07	-2,0	Galactose-1-phosphate uridyl transferase, synthesizes glucose-1-phosphate and UDP-galactose from UDP-D-glucose and alpha-D-galactose-1-phosphate in the second step of galactose catabolism
YHR200W	-1,07	-3,6	homolog of the mammalian S5a protein, component of 26S proteasome
YKL001C	-1,08	-4,9	Adenylylsulfate kinase, required for sulfate assimilation and involved in methionine metabolism
YAR075W	-1,09	-3,4	---
YFR032C	-1,11	-2,7	---
YNL319W	-1,12	-2,0	---
YPL054W	-1,13	-3,7	Protein of unknown function
YLR432W	-1,13	-3,9	Inosine monophosphate dehydrogenase, catalyzes the first step of GMP biosynthesis, member of a four-gene family in <i>S. cerevisiae</i> , constitutively expressed
YPL018W	-1,14	-4,2	Outer kinetochore protein, required for accurate mitotic chromosome segregation; forms a complex with Mcm21p and Okp1p that binds to centromeres via the CBF3 complex
YKL120W	-1,14	-4,6	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YLR213C	-1,15	-3,2	Protein with similarity to Crh1p, which is a putative glycosidase of the cell wall
YIL168W	-1,15	-4,4	---
YJL012C	-1,15	-5,3	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YMR038C	-1,15	-5,2	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p, involved in oxidative stress protection; Met-X-Cys-X2-Cys motif within the N-terminal portion is involved in insertion of copper into Sod1p under conditions of copper deprivation
YIL167W	-1,16	-3,6	---
YER042W	-1,16	-5,3	Peptide methionine sulfoxide reductase, reverses the oxidation of methionine residues; involved in oxidative damage repair, providing resistance to oxidative stress and regulation of lifespan
YOR348C	-1,16	-5,4	proline-specific permease (also capable of transporting alanine and glycine); putative proline-specific permease
YPL171C	-1,16	-2,7	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with slight differences in ligand binding and catalytic properties; may be involved in sterol metabolism

YER072W	-1,17	-3,4	Protein involved in vacuolar maintenance
YBR085W	-1,17	-2,7	Mitochondrial inner membrane ADP/ATP translocator, exchanges cytosolic ADP for mitochondrially synthesized ATP; expressed under anaerobic conditions; similar to Pet9p and Aac1p; has roles in maintenance of viability and in respiration
YAL067C	-1,18	-2,1	Putative permease, member of the allantoin transporter subfamily of the major facilitator superfamily; mutation confers resistance to ethionine sulfoxide
YDR533C	-1,18	-4,8	Possible chaperone and cysteine protease with similarity to E. coli Hsp31 and S. cerevisiae Hsp32p, Hsp33p, and Sno4p; member of the DJ-1/ThiJ/Pfpl superfamily, which includes human DJ-1 involved in Parkinson's disease; exists as a dimer
YOR313C	-1,18	-3,1	sporulation-specific protein
YDR522C	-1,18	-2,4	Middle/late gene of meiosis; involved in meiosis
YLR016C	-1,20	-3,5	---
YCL030C	-1,20	-5,3	Multifunctional enzyme containing phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase, phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, and histidinol dehydrogenase activities; catalyzes the second, third, ninth and tenth steps in histidine biosynthesis
YLL061W	-1,21	-3,9	High-affinity S-methylmethionine permease, required for utilization of S-methylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-adenosylmethionine permease Sam3p
YNL241C	-1,21	-5,6	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
YOR375C	-1,22	-3,8	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase, synthesizes glutamate from ammonia and alpha-ketoglutarate; rate of alpha-ketoglutarate utilization differs from Gdh3p; expression regulated by nitrogen and carbon sources
YJL101C	-1,28	-5,1	Gamma glutamylcysteine synthetase, catalyzes the first step in the gamma-glutamyl cycle for glutathione (GSH) biosynthesis; expression induced by oxidants, cadmium, and mercury
YOR032C	-1,29	-3,4	C2H2 zinc-finger protein with similarity to myc-family transcription factors; overexpression confers hyperfilamentous growth and suppresses the pseudohyphal filamentation defect of a diploid mep1 mep2 homozygous null mutant
YNL331C	-1,32	-5,4	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase; mutational analysis has not yet revealed a physiological role
YMR318C	-1,35	-3,9	NADPH-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase family member with broad substrate specificity; may be involved in fusel alcohol synthesis or in aldehyde tolerance
YOL165C	-1,35	-5,3	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase; mutational analysis has not yet revealed a physiological role
YPR194C	-1,37	-4,3	Oligopeptide transporter; member of the OPT family, with potential orthologs in S. pombe and C. albicans
YAR074C	-1,37	-5,6	---
YCLX10C	-1,38	-4,3	---
YDL124W	-1,44	-6,2	---
YAR073W	-1,51	-6,1	Nonfunctional protein with homology to IMP dehydrogenase; IMD1 is a probable pseudogene that is located close to the telomere and is not expressed at detectable levels
YDR481C	-1,51	-6,3	Repressible alkaline phosphatase, a glycoprotein localized to the vacuole; regulated by levels of inorganic phosphate and by a system consisting of Pho4p, Pho9p, Pho80p, Pho81p and Pho85p; dephosphorylates phosphotyrosyl peptides
YKR070W	-1,53	-5,6	---
YPR167C	-1,61	-6,8	3'-phosphoadenylylsulfate reductase, reduces 3'-phosphoadenylyl sulfate to adenosine-3',5'-bisphosphate and free sulfite using reduced thioredoxin as cosubstrate, involved in sulfate assimilation and methionine metabolism
YER091C	-1,61	-6,5	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase
YDL131W	-1,72	-5,1	Homocitrate synthase isozyme, catalyzes the condensation of acetyl-CoA and alpha-ketoglutarate to form homocitrate, which is the first step in the lysine biosynthesis pathway; highly similar to the other isozyme, Lys20p
YHR208W	-1,75	-5,4	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase, homolog of murine ECA39; highly expressed during logarithmic phase and repressed during stationary phase
YHR136C	-1,77	-7,9	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors, overproduction suppresses a plc1 null mutation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YML131W	-1,80	-7,8	---
YOL151W	-1,82	-7,9	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YCLX09W	-1,91	-4,1	---
YLR303W	-1,94	-8,8	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YLL029W	-1,95	-6,5	---
YER037W	-2,04	-6,5	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YNL142W	-2,05	-7,9	Ammonia permease; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH4+)
YBR093C	-2,13	-9,3	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YPL019C	-2,16	-9,2	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YDL081C	-2,17	-9,5	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YGL089C	-2,24	-7,4	alpha mating factor

YCR107W	-2,25	-9,0	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase; mutational analysis has not yet revealed a physiological role
YML116W	-2,26	-10,0	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily, required for resistance to aminotriazole and 4-nitroquinoline-N-oxide
YHR215W	-2,33	-10,5	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho1p; upregulated by phosphate starvation
YNL134C	-2,35	-7,7	---
YGL009C	-2,57	-11,4	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YCR098C	-2,72	-9,5	Plasma membrane permease, mediates uptake of the phosphatidylinositol metabolite glycerophosphoinositol as a source of the nutrients inositol and phosphate; expression and transport rate are regulated by phosphate and inositol availability
YML123C	-2,94	-9,7	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YAR071W	-3,20	-14,2	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YDL130W	-4,57	-18,5	Ribosomal protein P1 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YDR382W	-4,59	-14,9	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YOL039W	-4,62	-14,3	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm

Tabla A.4. Resultados del análisis de traductoma de D4567/W303 hibridado en microarrays de DNA (Y64.4K). LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

ORF	LogT	zs	Description
YLR319C	1,93	6,3	Actin- and formin-interacting protein, involved in actin cable nucleation and polarized cell growth; isolated as bipolar budding mutant; potential Cdc28p substrate
YNL036W	1,74	3,9	Carbonic anhydrase; poorly transcribed under aerobic conditions and at an undetectable level under anaerobic conditions; involved in non-classical protein export pathway
YFL014W	1,71	3,8	Plasma membrane localized protein that protects membranes from dessication; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YLR238W	1,68	3,8	Protein involved in G1 cell cycle arrest in response to pheromone, in a pathway different from the Far1p-dependent pathway; interacts with Far3p, Far7p, Far8p, Far9p, and Far11p; potential Cdc28p substrate
YOR204W	1,59	3,6	ATP-dependent DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)-box RNA helicase, required for translation initiation of all yeast mRNAs
YLR411W	1,55	4,9	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, acts as a trimer; gene is disrupted by a Ty2 transposon insertion in many laboratory strains of <i>S. cerevisiae</i>
YCLX01W	1,52	4,3	---
YCL017C	1,47	4,3	Required for the post-transcriptional thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs, also functions in mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis; NifS-like protein
YBL071C	1,41	4,1	---
YDL099W	1,40	3,2	---
YLR309C	1,38	3,1	Protein involved in vesicular transport, mediates transport between an endosomal compartment and the Golgi, contains a Golgi-localization (GRIP) domain that interacts with activated Arl1p-GTP to localize Imh1p to the Golgi
YLR276C	1,38	3,1	ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in biogenesis of the 60S ribosomal subunit
YBR115C	1,35	4,0	Alpha aminoadipate reductase, catalyzes the reduction of alpha-aminoadipate to alpha-aminoadipate 6-semialdehyde, which is the fifth step in biosynthesis of lysine; activation requires posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5p
YAL044C	1,32	3,5	H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
YPR112C	1,28	2,8	Essential conserved protein that associates with 35S precursor rRNA and is required for its initial processing at the A(0)-A(2) cleavage sites, shows partial nucleolar localization, contains five consensus RNA-binding domains
YLR275W	1,25	3,9	U1 snRNP protein of the Sm class
YDL024C	1,20	3,7	Protein of unknown function, involved in invasive and pseudohyphal growth
YLR262C	1,18	2,6	Ras-like GTP binding protein involved in the secretory pathway, required for fusion of endosome-derived vesicles with the late Golgi; has similarity to the human GTPase, Rab6

<i>YJR048W</i>	1,17	2,7	Cytochrome c, isoform 1; electron carrier of the mitochondrial intermembrane space that transfers electrons from ubiquinone-cytochrome c oxidoreductase to cytochrome c oxidase during cellular respiration
<i>YLR280C</i>	1,15	4,4	---
<i>YLR266C</i>	1,15	4,5	Transcription factor; targets include ATP-binding cassette (ABC) transporters, major facilitator superfamily transporters, and other genes involved in the pleiotropic drug resistance (PDR) phenomenon
<i>YOR202W</i>	1,14	3,0	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
<i>YLR242C</i>	1,13	3,9	Protein with similarity to Nup120p and <i>C.elegans</i> R05H5.5 protein
<i>YOR020C</i>	1,13	2,5	Mitochondrial matrix co-chaperonin that inhibits the ATPase activity of Hsp60p, a mitochondrial chaperonin; involved in protein folding and sorting in the mitochondria; 10 kD heat shock protein with similarity to <i>E. coli</i> groES
<i>YLR274W</i>	1,12	3,3	Component of the hexameric MCM complex, which is important for priming origins of DNA replication in G1 and becomes an active ATP-dependent helicase that promotes DNA melting and elongation when activated by Cdc7p-Dbf4p in S-phase
<i>YBL106C</i>	1,11	3,3	Suppressor of defect in the small GTPase Rho3p; yeast homolog of the <i>Drosophila</i> tumor suppressor, lethal giant larvae
<i>YER039C</i>	1,10	3,1	Protein of unknown function, has homology to Vrg4p
<i>YLR295C</i>	1,09	2,6	Subunit h of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
<i>YNR074C</i>	1,06	3,1	---
<i>YGR079W</i>	1,05	3,5	---
<i>YMR141C</i>	1,03	3,9	---
<i>YIL127C</i>	1,03	2,7	---
<i>YGR030C</i>	1,01	3,2	Subunit of both RNase MRP, which cleaves pre-rRNA, and nuclear RNase P, which cleaves tRNA precursors to generate mature 5' ends
<i>YOL109W</i>	1,00	2,3	Peripheral membrane protein of the plasma membrane that interacts with Mid2p; regulates the cell integrity pathway mediated by Pkc1p and Slr2p
<i>YLR323C</i>	1,00	3,1	Essential protein, component of a complex containing Cef1p; has similarity to <i>S. pombe</i> Cwf24p
<i>YOR203W</i>	1,00	2,9	---
<i>YEL053C</i>	-1,00	-2,9	Non-catalytic subunit of N-terminal acetyltransferase of the NatC type, required for replication of dsRNA virus; expression is glucose-repressible
<i>YOR032C</i>	-1,00	-4,0	C2H2 zinc-finger protein with similarity to myc-family transcription factors; overexpression confers hyperfilamentous growth and suppresses the pseudohyphal filamentation defect of a diploid mep1 mep2 homozygous null mutant
<i>YFL004W</i>	-1,01	-3,0	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
<i>YDL239C</i>	-1,02	-3,1	Protein required for spore wall formation, thought to mediate assembly of a Don1p-containing structure at the leading edge of the prospore membrane via interaction with spindle pole body components; potentially phosphorylated by Cdc28p
<i>YHR216W</i>	-1,04	-2,8	Inosine monophosphate dehydrogenase, catalyzes the first step of GMP biosynthesis, expression is induced by mycophenolic acid resulting in resistance to the drug, expression is repressed by nutrient limitation
<i>YDR042C</i>	-1,04	-2,8	---
<i>YER090W</i>	-1,04	-2,5	anthranilate synthase Component I
<i>YIR032C</i>	-1,05	-3,8	Ureidoglycolate hydrolase, converts ureidoglycolate to glyoxylate and urea in the third step of allantoin degradation; expression sensitive to nitrogen catabolite repression
<i>YGL088W</i>	-1,05	-3,9	---
<i>YDR387C</i>	-1,05	-3,4	---
<i>YOR315W</i>	-1,06	-3,1	---
<i>YHR130C</i>	-1,06	-2,5	---
<i>YCR107W</i>	-1,06	-3,6	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase; mutational analysis has not yet revealed a physiological role
<i>YDR533C</i>	-1,06	-2,8	Possible chaperone and cysteine protease with similarity to <i>E. coli</i> Hsp31 and <i>S. cerevisiae</i> Hsp32p, Hsp33p, and Sno4p; member of the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily, which includes human DJ-1 involved in Parkinson's disease; exists as a dimer
<i>YFL022C</i>	-1,07	-2,4	Alpha subunit of cytoplasmic phenylalanyl-tRNA synthetase, forms a tetramer with Frs1p to form active enzyme; evolutionarily distant from mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase based on protein sequence, but substrate binding is similar
<i>YHR200W</i>	-1,07	-2,5	homolog of the mammalian S5a protein, component of 26S proteasome
<i>YLR016C</i>	-1,08	-2,7	---
<i>YML131W</i>	-1,08	-3,2	---
<i>YJL120W</i>	-1,08	-2,4	---
<i>YHL021C</i>	-1,09	-3,2	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
<i>YER072W</i>	-1,10	-2,5	Protein involved in vacuolar maintenance
<i>YOL151W</i>	-1,12	-3,1	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway

YNL007C	-1,13	-2,5	HSP40 family chaperone; sit4 suppressor, dnaJ homolog
YGL037C	-1,15	-3,8	NAD(+) salvage pathway gene; pyrazinamidase and nicotinamidase
YDL144C	-1,15	-4,7	---
YOR230W	-1,15	-2,0	WD repeat containing transcriptional modulator 1; Transcriptional modulator
YOL086C	-1,15	-2,2	Alcohol dehydrogenase, involved in the production of certain carboxylate esters
YIL119C	-1,16	-4,3	Putative transcriptional regulator; overexpression suppresses the heat shock sensitivity of wild-type RAS2 overexpression and also suppresses the cell lysis defect of an mpk1 mutation
YHR208W	-1,17	-4,2	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase, homolog of murine ECA39; highly expressed during logarithmic phase and repressed during stationary phase
YLR432W	-1,18	-2,7	Inosine monophosphate dehydrogenase, catalyzes the first step of GMP biosynthesis, member of a four-gene family in <i>S. cerevisiae</i> , constitutively expressed
YGL184C	-1,18	-3,3	Cystathionine beta-lyase, converts cystathionine into homocysteine
YAL045C	-1,19	-2,0	---
YNL055C	-1,19	-2,2	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel), outer membrane protein required for the maintenance of mitochondrial osmotic stability and mitochondrial membrane permeability
YFL021W	-1,22	-2,8	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression, member of the GATA family of DNA binding proteins; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p
YMR173W-A	-1,22	-3,3	---
YDR516C	-1,23	-4,6	Non-essential protein of unknown function required for transcriptional induction of the early meiotic-specific transcription factor IME1, also required for sporulation
YGR254W	-1,24	-2,4	Enolase I, catalyzes the first common step of glycolysis and gluconeogenesis; expression is repressed in response to glucose
YML045W	-1,25	-2,8	---
YML116W	-1,25	-4,3	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily, required for resistance to aminotriazole and 4-nitroquinoline-N-oxide
YBR092C	-1,26	-4,5	Constitutively expressed acid phosphatase similar to Pho5p; brought to the cell surface by transport vesicles; hydrolyzes thiamin phosphates in the periplasmic space, increasing cellular thiamin uptake; expression is repressed by thiamin
YJL012C	-1,26	-2,9	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YLR134W	-1,27	-2,4	Minor isoform of pyruvate decarboxylase, key enzyme in alcoholic fermentation, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde, regulation is glucose- and ethanol-dependent, repressed by thiamine, involved in amino acid catabolism
YGR161C	-1,27	-3,9	Hypothetical ORF
YMR173W	-1,28	-3,0	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; contains multiple repeats of the amino acid sequence NNDSYGS
YKL120W	-1,29	-4,3	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YOR313C	-1,30	-4,3	sporulation-specific protein
YDR074W	-1,30	-3,7	Trehalose-6-phosphate phosphatase
YAR074C	-1,30	-4,6	---
YCR030C	-1,31	-3,5	Protein with a potential role in actin cytoskeletal organization; overexpression suppresses a pfy1 (profilin) null mutation
YHR174W	-1,31	-2,5	Enolase II, catalyzes the first common step of glycolysis and gluconeogenesis; expression is induced in response to glucose
YPL019C	-1,31	-3,1	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YHR178W	-1,31	-3,1	binds Sin3p in two-hybrid assay; Zinc finger (6-Cys)
YPR194C	-1,31	-4,8	Oligopeptide transporter; member of the OPT family, with potential orthologs in <i>S. pombe</i> and <i>C. albicans</i>
YCR098C	-1,37	-4,9	Plasma membrane permease, mediates uptake of the phosphatidylinositol metabolite glycerophosphoinositol as a source of the nutrients inositol and phosphate; expression and transport rate are regulated by phosphate and inositol availability
YHR215W	-1,37	-4,0	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YGL009C	-1,41	-4,3	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YBR012W-A	-1,41	-2,4	---
YMR051C	-1,43	-3,0	---
YDR018C	-1,44	-3,7	---
YER081W	-1,46	-4,6	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser33p
YER091C	-1,46	-4,8	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate homocysteine methyltransferase
YAR073W	-1,48	-5,7	Nonfunctional protein with homology to IMP dehydrogenase; IMD1 is a probable

			pseudogene that is located close to the telomere and is not expressed at detectable levels
YMR303C	-1,49	-2,6	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II, involved in the production of certain carboxylate esters
YDL124W	-1,51	-5,2	---
YJR028W	-1,51	-2,6	---
YDR481C	-1,52	-5,7	Repressible alkaline phosphatase, a glycoprotein localized to the vacuole; regulated by levels of inorganic phosphate and by a system consisting of Pho4p, Pho9p, Pho80p, Pho81p and Pho85p; dephosphorylates phosphotyrosyl peptides
YBR093C	-1,53	-4,9	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YJR026W	-1,59	-2,8	---
YML040W	-1,62	-3,7	---
YLL029W	-1,64	-3,7	---
YMR046C	-1,76	-3,0	---
YNL142W	-1,84	-6,8	Ammonia permease; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH ₄ ⁺)
YBL005W-A	-1,86	-3,2	---
YER037W	-1,96	-7,3	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YAR010C	-1,97	-3,4	---
YAR071W	-2,00	-7,2	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YLR303W	-2,04	-6,7	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YDL131W	-2,10	-4,2	Homocitrate synthase isozyme, catalyzes the condensation of acetyl-CoA and alpha-ketoglutarate to form homocitrate, which is the first step in the lysine biosynthesis pathway; highly similar to the other isozyme, Lys20p
YOR375C	-2,17	-3,8	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase, synthesizes glutamate from ammonia and alpha-ketoglutarate; rate of alpha-ketoglutarate utilization differs from Gdh3p; expression regulated by nitrogen and carbon sources
YGL089C	-2,17	-3,8	alpha mating factor
YNL134C	-2,37	-4,2	---
YDL081C	-3,40	-7,9	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YDR382W	-4,39	-7,8	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YOL039W	-4,72	-8,4	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YDL130W	-4,74	-12,6	Ribosomal protein P1 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component

Tabla A.5. Resultados del análisis de transcriptoma de D4567/W303 hibridado en microarrays de Affymetrix YGS98. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

ORF	LogT	zs	Descripción
YLR411W	3,89	8,2	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, acts as a trimer; gene is disrupted by a Ty2 transposon insertion in many laboratory strains of <i>S. cerevisiae</i>
Q0185_ex1	3,75	7,9	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
Q0185_ex6	3,55	7,5	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YOR202W	3,55	7,4	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YNR074C	3,44	7,2	Mitochondrial cell death effector that translocates to the nucleus in response to apoptotic stimuli, homolog of mammalian Apoptosis-Inducing Factor, putative reductase
Q0185_ex4	3,19	6,7	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YOR203W	3,04	6,4	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
Q0115	2,42	5,1	Subunit III of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial

Q0205	2,32	4,9	inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YDL037C	2,26	4,8	Endonuclease I-SceIV, involved in intron mobility; encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
Q0280_ex1	2,12	4,5	Protein of unconfirmed function, similar to cell surface flocculin Muc1p; ORF exhibits genomic organization compatible with a translational readthrough-dependent mode of expression
YGR122C-A	2,06	4,4	Cytochrome b
Q0185_ex5	1,93	4,1	YGR122C-A hypothetical protein
YLR280C	1,90	4,0	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YLR274W	1,76	3,7	YLR280C questionable ORF
YDL039C	1,70	3,6	Component of the hexameric MCM complex, which is important for priming origins of DNA replication in G1 and becomes an active ATP-dependent helicase that promotes DNA melting and elongation when activated by Cdc7p-Dbf4p in S-phase
YNR055C	1,67	3,5	Pheromone-regulated protein, predicted to have one transmembrane segment; promoter contains Gcn4p binding elements
Q0183	1,64	3,5	Putative ion transporter similar to the major facilitator superfamily of transporters; mutations in membrane-spanning domains permit nonselective cation uptake
YIL080W	1,60	3,4	Reverse transcriptase required for splicing of the COX1 pre-mRNA, encoded by a mobile group II intron within the mitochondrial COX1 gene
YLR281C	1,60	3,4	TyB Gag-Pol protein; proteolytically processed to make the Gag, RT, PR, and IN proteins that are required for retrotransposition
YLR280C	1,56	3,3	Hypothetical ORF
Q0280_ex5	1,56	3,3	Hypothetical ORF
YLR467W_2	1,56	3,3	Cytochrome b
YLR243W	1,55	3,3	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YCL017C	1,51	3,2	Protein required for cell viability
YKL051W	1,51	3,2	Cysteine desulfurase involved in iron-sulfur cluster (Fe/S) biogenesis; required for the post-transcriptional thio-modification of mitochondrial and cytoplasmic tRNAs; essential protein located predominantly in mitochondria
YLR336C	1,45	3,1	Suppressor of PI Four Kinase
YLR237W	1,45	3,1	Essential nuclear protein with a possible role in the osmoregulatory glycerol response; interacts with phospholipase C (Plc1p); putative homolog of human NOM1 which is implicated in acute myeloid leukemia
YKL163W	1,40	3,0	Plasma membrane transporter responsible for the uptake of thiamine, member of the major facilitator superfamily of transporters; mutation of human ortholog causes thiamine-responsive megaloblastic anemia
YLR247C	1,39	3,0	O-glycosylated covalently-bound cell wall protein required for cell wall stability; expression is cell cycle regulated, peaking in M/G1 and also subject to regulation by the cell integrity pathway
YLR275W_ex2	1,38	2,9	Hypothetical ORF
YLR277C	1,38	2,9	U1 snRNP protein of the Sm class
YNL339C_ex2_2	1,37	2,9	subunit of Polyadenylation factor I (PF I)
YLR291C	1,33	2,8	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YLR228C	1,33	2,8	Beta subunit of the translation initiation factor eIF2B, the guanine-nucleotide exchange factor for eIF2; activity subsequently regulated by phosphorylated eIF2; first identified as a negative regulator of GCN4 expression
Q0280_ex3	1,32	2,8	Sterol regulatory element binding protein, regulates transcription of the sterol biosynthetic genes ERG2 and ERG3; member of the fungus-specific Zn[2]-Cys[6] binuclear cluster family of transcription factors; homologous to Upc2p
YDL038C	1,28	2,7	Cytochrome b
Q0185_ex10	1,28	2,7	Hypothetical ORF
YLR467W_1	1,25	2,7	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YDR019C	1,24	2,6	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YLR319C	1,23	2,6	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
YLR326W	1,22	2,6	Actin- and formin-interacting protein, involved in actin cable nucleation and polarized cell growth; isolated as bipolar budding mutant; potential Cdc28p substrate
YCR028C	1,21	2,6	Hypothetical ORF
YLR276C	1,21	2,6	Plasma membrane H ⁺ -pantothenate symporter; confers sensitivity to the antifungal agent fenpropimorph
Q0280_ex4	1,17	2,5	ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in biogenesis of the 60S ribosomal subunit
YLR328W	1,17	2,5	Cytochrome b
YLR242C	1,17	2,5	Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, involved in NAD(+) salvage pathway
YLR335W	1,16	2,5	Protein required for normal intracellular sterol distribution and for sphingolipid metabolism; similar to Nup120p and C. elegans R05H5.5 protein
Q0242_ex1	1,15	2,5	Protein involved in nucleocytoplasmic transport, binds to either the nucleoplasmic or cytoplasmic faces of the nuclear pore complex depending on Ran-GTP levels; also has a role in chromatin organization
			endonuclease SCEI, small subunit Found forward in NC_001224 between 46046 and

			46361 with 69.393939% identity.
YLR316C	1,15	2,4	tRNA-specific adenosine-34 deaminase subunit Tad3p
YLR239C	1,15	2,4	Lipoyl ligase, involved in the modification of mitochondrial enzymes by the attachment of lipoic acid groups
YOL152W	1,13	2,4	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low copper levels but not by low iron levels
YMR107W	1,13	2,4	Protein required for survival at high temperature during stationary phase; not required for growth on nonfermentable carbon sources
YLR309C	1,12	2,4	Protein involved in vesicular transport, mediates transport between an endosomal compartment and the Golgi, contains a Golgi-localization (GRIP) domain that interacts with activated Arl1p-GTP to localize Imh1p to the Golgi
YLL012W	1,12	2,4	Steryl ester hydrolase, one of three gene products (Yeh1p, Yeh2p, Tgl1p) responsible for steryl ester hydrolase activity and involved in sterol homeostasis; localized to lipid particle membranes
YLR270W	1,11	2,4	YLR270W strong similarity to YOR173w
YJR127C	1,11	2,4	Zinc-finger protein that localizes to the nucleus, putative transcriptional regulator of ALD6
YBR085c-a	1,11	2,4	Hypothetical ORF
YOR298C-A	1,10	2,4	Transcriptional coactivator that bridges the DNA-binding region of Gcn4p and TATA-binding protein Spt15p; suppressor of frameshift mutations
YNL282W	1,10	2,4	Subunit of both RNase MRP, which cleaves pre-rRNA, and nuclear RNase P, which cleaves tRNA precursors to generate mature 5' ends
YLR324W	1,10	2,3	Peroxisomal integral membrane protein, involved in negative regulation of peroxisome number; partially functionally redundant with Pex31p; genetic interactions suggest action at a step downstream of steps mediated by Pex28p and Pex29p
YLR332W	1,09	2,3	O-glycosylated plasma membrane protein that acts as a sensor for cell wall integrity signaling and activates the pathway; interacts with Rom2p, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1p, and with cell integrity pathway protein Zeo1p
YNR044W	1,09	2,3	Anchorage subunit of a-agglutinin of a-cells, highly O-glycosylated protein with N-terminal secretion signal and C-terminal signal for addition of GPI anchor to cell wall, linked to adhesion subunit Aga2p via two disulfide bonds
YLR244C	1,09	2,3	YLR244C methionine aminopeptidase
YCR020W-B	1,08	2,3	Subunit of the RSC chromatin remodeling complex, a multisubunit complex that functions in transcriptional regulation, chromosome stability and establishing sister chromatid cohesion
YLR278C	1,08	2,3	Protein of unknown function, localizes to the nucleus; potential Cdc28p substrate
YLR257W	1,08	2,3	Hypothetical ORF
YBL106C	1,07	2,3	Protein with roles in exocytosis and cation homeostasis; functions in docking and fusion of post-Golgi vesicles with plasma membrane; homolog of Sro7p and Drosophila lethal giant larvae tumor suppressor; interacts with SNARE protein Sec9p
YLR290C	1,07	2,3	Hypothetical ORF
YGR138C	1,06	2,3	YGR138C similarity to multidrug resistance proteins
YBR244W	1,05	2,2	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced by glucose starvation that protects cells from phospholipid hydroperoxides and nonphospholipid peroxides during oxidative stress
YLR315W	1,05	2,2	Non-essential kinetochore protein, subunit of the Ctf19 central kinetochore complex (Ctf19p-Mcm21p-Okp1p-Mcm22p-Mcm16p-Ctf3p-Chl4p-Mcm19p-Nkp1p-Nkp2p-Ame1p-Mtw1p)
YLR240W	1,04	2,2	Phosphatidylinositol 3-kinase responsible for the synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate; forms membrane-associated signal transduction complex with Vps15p to regulate protein sorting; similar to p110 subunit of mammalian PI 3-kinase
YER020W	1,03	2,2	Nucleotide binding alpha subunit of the heterotrimeric G protein that interacts with the receptor Gpr1p, has signaling role in response to nutrients; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery
YLR305C	1,02	2,2	Phosphatidylinositol-4-kinase that functions in the Pkc1p protein kinase pathway; required for normal vacuole morphology, cell wall integrity, and actin cytoskeleton organization
YMR069W	1,02	2,2	N alpha-acetyl-transferase, involved in acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A
YLR313C	1,02	2,2	Protein involved in shmoo formation and bipolar bud site selection; homologous to Spa2p, localizes to sites of polarized growth in a cell cycle dependent- and Spa2p-dependent manner, interacts with MAPKKs Mkk1p, Mkk2p, and Ste7p
YML016C	1,02	2,2	Serine/threonine protein phosphatase Z, isoform of Ppz2p; involved in regulation of potassium transport, which affects osmotic stability, cell cycle progression, and halotolerance
YLR323C	1,01	2,2	Essential protein, component of a complex containing Cef1p; has similarity to S. pombe Cwf24p
Q0185_ex8	1,01	2,2	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YLR320W	1,00	2,1	Protein involved in resistance to ionizing radiation; acts with Mms1p in a repair pathway that may be involved in resolving replication intermediates or preventing the damage caused by blocked replication forks
YBR219C_ex2	-1,01	-2,1	Hypothetical ORF
YNL183C	-1,02	-2,1	Protein kinase that stabilizes several plasma membrane amino acid transporters by antagonizing their ubiquitin-mediated degradation
YMR193C-A	-1,03	-2,1	YMR193C-A questionable ORF
YBR145W	-1,05	-2,1	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V; involved in ethanol production
YEL072W	-1,06	-2,1	Protein required for sporulation

YIL119C	-1,06	-2,2	Putative transcriptional regulator; overexpression suppresses the heat shock sensitivity of wild-type RAS2 overexpression and also suppresses the cell lysis defect of an mpk1 mutation
YDR516C	-1,07	-2,2	Non-essential protein of unknown function required for transcriptional induction of the early meiotic-specific transcription factor IME1, also required for sporulation
YKR071C	-1,07	-2,2	Protein of unknown function; mutation displays synthetic lethal interaction with the pol3-13 allele of CDC2
YJR129C	-1,07	-2,2	Putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of the seven beta-strand family
YGR226C	-1,08	-2,2	YGR226C hypothetical protein
YGR286C	-1,08	-2,2	Biotin synthase, catalyzes the conversion of dethiobiotin to biotin, which is the last step of the biotin biosynthesis pathway; complements <i>E. coli</i> bioB mutant
YHR048W	-1,09	-2,2	Hypothetical ORF
YIL121W	-1,09	-2,2	Multidrug transporter required for resistance to quinidine, barban, cisplatin, and bleomycin; member of the major facilitator superfamily of transporters conferring multiple drug resistance (MFS-MDR)
YDL131W	-1,09	-2,2	Homocitrate synthase isozyme, catalyzes the condensation of acetyl-CoA and alpha-ketoglutarate to form homocitrate, which is the first step in the lysine biosynthesis pathway; highly similar to the other isozyme, Lys20p
YDL198C	-1,10	-2,2	Mitochondrial GTP/GDP transporter, essential for mitochondrial genome maintenance; has a role in mitochondrial iron transport; member of the mitochondrial carrier family; (putative) mitochondrial carrier protein
YKR093W	-1,10	-2,2	Integral membrane peptide transporter, mediates transport of di- and tri-peptides; conserved protein that contains 12 transmembrane domains; PTR2 expression is regulated by the N-end rule pathway via repression by Cup9p
YJL101C	-1,11	-2,2	Gamma glutamylcysteine synthetase, catalyzes the first step in the gamma-glutamyl cycle for glutathione (GSH) biosynthesis; expression induced by oxidants, cadmium, and mercury
YER069W	-1,11	-2,3	Protein that is processed in the mitochondrion to yield acetylglutamate kinase and N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, which catalyze the 2nd and 3rd steps in arginine biosynthesis; enzymes form a complex with Arg2p
YGR161C	-1,13	-2,3	Putative component of the protein phosphatase type 2A complex
YDL021W	-1,14	-2,3	Homolog of Gpm1p phosphoglycerate mutase which converts 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate in glycolysis; may be non-functional derivative of a gene duplication event
YIR034C	-1,14	-2,3	Saccharopine dehydrogenase (NAD ⁺ , L-lysine-forming), catalyzes the conversion of saccharopine to L-lysine, which is the final step in the lysine biosynthesis pathway
YKR011C	-1,14	-2,3	Hypothetical ORF
YDL130W-A	-1,16	-2,4	ATPase stabilizing factor
YGL125W	-1,17	-2,4	Isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase, catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate in the methionine biosynthesis pathway
YDL169C	-1,17	-2,4	Protein of unknown function
YMR038C	-1,18	-2,4	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p, involved in oxidative stress protection; Met-X-Cys-X2-Cys motif within the N-terminal portion is involved in insertion of copper into Sod1p under conditions of copper deprivation
YHR015W	-1,18	-2,4	Putative RNA-binding protein, interacts with Mex67p, which is a component of the nuclear pore involved in nuclear mRNA export
YPR160W	-1,18	-2,4	Non-essential glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen, activity is regulated by cyclic AMP-mediated phosphorylation, expression is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway
YJL212C	-1,20	-2,4	Plasma membrane transporter that transports tetra- and pentapeptides and glutathione; member of the OPT family
YIL168W	-1,21	-2,5	L-serine dehydratase
YKR069W	-1,21	-2,5	S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase, involved in sulfate assimilation, methionine metabolism, and siroheme biosynthesis
YLL055W	-1,21	-2,5	Hypothetical ORF
YJR025C	-1,21	-2,5	3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase, required for biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan via kynurenine pathway
YPL092W	-1,23	-2,5	Plasma membrane sulfite pump involved in sulfite metabolism and required for efficient sulfite efflux; major facilitator superfamily protein
YBR147W	-1,24	-2,5	Hypothetical ORF
YGL255W	-1,26	-2,6	High-affinity zinc transporter of the plasma membrane, responsible for the majority of zinc uptake; transcription is induced under low-zinc conditions by the Zap1p transcription factor
YOR315W	-1,26	-2,6	Protein of unknown function, found in the cytoplasm and the nucleus; potential Cdc28p substrate
YIR030C	-1,28	-2,6	Protein of unknown function, expression is sensitive to nitrogen catabolite repression and regulated by Dal80p; contains transmembrane domain
YEL059C-A	-1,29	-2,6	Protein whose overexpression suppresses the imp1 mutation, may be required for the function of the Imp1p mitochondrial inner membrane peptidase and/or the protein sorting machinery
YMR173W	-1,29	-2,6	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; contains multiple repeats of the amino acid sequence NNDSYGS
YGR032W	-1,31	-2,7	Catalytic subunit of 1,3-beta-glucan synthase, has similarity to an alternate catalytic subunit, Fks1p (Gsc1p); Rho1p encodes the regulatory subunit; involved in cell wall

			synthesis and maintenance
YAL067C	-1,32	-2,7	Putative permease, member of the allantate transporter subfamily of the major facilitator superfamily; mutation confers resistance to ethionine sulfoxide
YMR318C	-1,32	-2,7	NADPH-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase family member with broad substrate specificity; may be involved in fusel alcohol synthesis or in aldehyde tolerance
YDL243C	-1,32	-2,7	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YKL029C	-1,33	-2,7	Mitochondrial malic enzyme, catalyzes the oxidative decarboxylation of malate to pyruvate, which is a key intermediate in sugar metabolism and a precursor for synthesis of several amino acids
YDR481C	-1,34	-2,7	Repressible alkaline phosphatase, a glycoprotein localized to the vacuole; regulated by levels of inorganic phosphate and by a system consisting of Pho4p, Pho9p, Pho80p, Pho81p and Pho85p; dephosphorylates phosphotyrosyl peptides
YGR121C	-1,35	-2,8	Ammonium permease; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH ₄ ⁺); expression is under the nitrogen catabolite repression regulation
YIL074C	-1,35	-2,8	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser3p
YMR173W-A	-1,36	-2,8	YMR173W-A questionable ORF
YCL025C	-1,39	-2,8	Low-affinity amino acid permease with broad substrate range, involved in uptake of asparagine, glutamine, and other amino acids; expression is regulated by the SPS plasma membrane amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)
YPL274W	-1,40	-2,9	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YMR081C	-1,41	-2,9	Serine-rich, hydrophilic protein with similarity to Mbr1p; overexpression suppresses growth defects of hap2, hap3, and hap4 mutants; expression is under glucose control; cotranscribed with NAM7 in a cyp1 mutant
YER042W	-1,42	-2,9	Peptide methionine sulfoxide reductase, reverses the oxidation of methionine residues; involved in oxidative damage repair, providing resistance to oxidative stress and regulation of lifespan
YCL026C-A	-1,48	-3,0	Protein of unknown function, involved in the integration of lipid signaling pathways with cellular homeostasis
YGR233C	-1,50	-3,1	Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, regulates Pho80p-Pho85p and Pcl7p-Pho85p cyclin-CDK complexes in response to phosphate levels; required for derepression of PHO5; transcriptionally regulated by Pho4p and Pho2p
YNL100W	-1,50	-3,1	Hypothetical ORF
YKL071W	-1,51	-3,1	Hypothetical ORF
YIL167W	-1,52	-3,1	Hypothetical ORF
YER080W	-1,53	-3,1	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
YBR008C	-1,56	-3,2	Plasma membrane multidrug transporter, member of the major facilitator superfamily; involved in efflux of fluconazole, diazaborine, benomyl, methotrexate, and other drugs
YBR066C	-1,56	-3,2	Transcriptional repressor that mediates glucose repression and negatively regulates filamentous growth; has similarity to Nrg1p
YLR348C	-1,61	-3,3	Mitochondrial dicarboxylate carrier, integral membrane protein, catalyzes a dicarboxylate-phosphate exchange across the inner mitochondrial membrane, transports cytoplasmic dicarboxylates into the mitochondrial matrix
YFR015C	-1,65	-3,4	Glycogen synthase with similarity to Gsy2p, the more highly expressed yeast homolog; expression induced by glucose limitation, nitrogen starvation, environmental stress, and entry into stationary phase
YLR303W	-1,66	-3,4	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YOL058W	-1,67	-3,4	Arginosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
YJR137C	-1,69	-3,5	Sulfite reductase beta subunit, involved in amino acid biosynthesis, transcription repressed by methionine
YHL036W	-1,69	-3,5	Low affinity methionine permease, similar to Mup1p
YHR208W	-1,72	-3,5	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase, homolog of murine ECA39; highly expressed during logarithmic phase and repressed during stationary phase
YBR072W	-1,74	-3,6	Small heat shock protein with chaperone activity that is regulated by a heat induced transition from an inactive oligomeric (24-mer) complex to an active dimer; induced by heat, upon entry into stationary phase, and during sporulation
YLL062C	-1,75	-3,6	S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase, functions along with Sam4p in the conversion of S-adenosylmethionine (AdoMet) to methionine to control the methionine/AdoMet ratio
YCL030C	-1,75	-3,6	Multifunctional enzyme containing phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase, phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, and histidinol dehydrogenase activities; catalyzes the second, third, ninth and tenth steps in histidine biosynthesis
YER072W	-1,76	-3,6	Protein involved in vacuolar maintenance
YOL151W	-1,76	-3,6	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YML131W	-1,77	-3,6	Hypothetical ORF
YDR533C	-1,81	-3,7	Possible chaperone and cysteine protease with similarity to <i>E. coli</i> Hsp31 and <i>S. cerevisiae</i> Hsp32p, Hsp33p, and Sno4p; member of the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily, which includes human DJ-1 involved in Parkinson's disease; exists as a dimer
YPR167C	-1,82	-3,7	3'-phosphoadenylylsulfate reductase, reduces 3'-phosphoadenylyl sulfate to adenosine-3',5'-

			bisphosphate and free sulfite using reduced thioredoxin as cosubstrate, involved in sulfate assimilation and methionine metabolism
YDL124W	-1,88	-3,9	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase; reduces aromatic alpha-keto amides, aliphatic alpha-keto esters, and aromatic alpha-keto esters
YJL012C	-1,95	-4,0	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YFR030W	-1,96	-4,0	Subunit alpha of assimilatory sulfite reductase, which is responsible for the conversion of sulfite into sulfide
YBR157C	-1,96	-4,0	Protein of unknown function; null mutation does not confer any obvious defects in growth, spore germination, viability, or carbohydrate utilization
YJR079W_ex1	-2,03	-4,2	Hypothetical ORF
YER091C	-2,06	-4,2	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase
YIR017C	-2,10	-4,3	Transcriptional activator in the Cbf1p-Met4p-Met28p complex, participates in the regulation of sulfur metabolism
YHR029C	-2,10	-4,3	Hypothetical ORF
YHL028W	-2,11	-4,3	cell wall integrity and stress response component 4; Putative integral membrane protein containing novel cysteine motif. Similarity to SLG1 (WSC1), WSC2 and WSC3
YJL052W	-2,12	-4,4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
YGL184C	-2,13	-4,4	Cystathionine beta-lyase, converts cystathionine into homocysteine
YJR010W	-2,14	-4,4	ATP sulfurylase, catalyzes the primary step of intracellular sulfate activation, essential for assimilatory reduction of sulfate to sulfide, involved in methionine metabolism
YJR078W	-2,16	-4,4	Tryptophan 2,3-dioxygenase, required for biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan via kynurenine pathway
YKL103C	-2,18	-4,5	Vacuolar aminopeptidase, often used as a marker protein in studies of autophagy and cytosol to vacuole targeting (CVT) pathway
YER081W	-2,18	-4,5	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser33p
YKL120W	-2,19	-4,5	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YFL021W	-2,20	-4,5	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression, member of the GATA family of DNA binding proteins; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p
YKR076W	-2,20	-4,5	Non-essential protein of unknown function; similar to Ygr154cp
YIR032C	-2,21	-4,5	Ureidoglycolate hydrolase, converts ureidoglycolate to glyoxylate and urea in the third step of allantoin degradation; expression sensitive to nitrogen catabolite repression
YER067W	-2,24	-4,6	Hypothetical ORF
YML116W	-2,25	-4,6	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily, required for resistance to aminotriazole and 4-nitroquinoline-N-oxide
YNL134C	-2,36	-4,9	YNL134C similarity to C.carbonum toxD gene
YNR034w-a	-2,39	-4,9	Hypothetical ORF
YGL089C	-2,43	-5,0	Mating pheromone alpha-factor, made by alpha cells; interacts with mating type a cells to induce cell cycle arrest and other responses leading to mating; also encoded by MF(ALPHA)1, which is more highly expressed than MF(ALPHA)2
YMR090W	-2,45	-5,1	Hypothetical ORF
YMR006C	-2,45	-5,1	Phospholipase B (lysophospholipase) involved in phospholipid metabolism; displays transacylase activity in vitro; overproduction confers resistance to lysophosphatidylcholine
YLR092W	-2,47	-5,1	High affinity sulfate permease; sulfate uptake is mediated by specific sulfate transporters Sul1p and Sul2p, which control the concentration of endogenous activated sulfate intermediates
YNL142W	-2,56	-5,3	Ammonium permease involved in regulation of pseudohyphal growth; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH4+); expression is under the nitrogen catabolite repression regulation
YGL009C	-2,57	-5,3	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YER037W	-2,60	-5,4	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YPR194C	-2,61	-5,4	Oligopeptide transporter; member of the OPT family, with potential orthologs in S. pombe and C. albicans
YKL001C	-2,72	-5,6	Adenylylsulfate kinase, required for sulfate assimilation and involved in methionine metabolism
YPL019C	-2,76	-5,7	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YFL056C	-2,86	-5,9	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YFL057C	-3,02	-6,2	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YOR348C	-3,03	-6,3	Proline permease, required for high-affinity transport of proline; also transports the toxic proline analog azetidine-2-carboxylate (AzC); PUT4 transcription is repressed in ammonia-grown cells
YNL277W	-3,36	-6,9	L-homoserine-O-acetyltransferase, catalyzes the conversion of homoserine to O-acetyl homoserine which is the first step of the methionine biosynthetic pathway
YDR281C	-3,42	-7,1	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels
YPL171C	-3,52	-7,3	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with slight differences in ligand binding and catalytic properties; may be involved in sterol metabolism

YBR093C	-3,92	-8,1	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YAR071W	-3,98	-8,2	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YLL060C	-4,14	-8,6	Glutathione S-transferase capable of homodimerization; functional overlap with Gtt2p, Grx1p, and Grx2p
YML123C	-4,35	-9,0	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YHR136C	-4,73	-9,8	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors, overproduction suppresses a plc1 null mutation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YKR039W	-4,81	-10,0	General amino acid permease; localization to the plasma membrane is regulated by nitrogen source
YCR098C	-4,90	-10,2	Plasma membrane permease, mediates uptake of the phosphatidylinositol metabolite glycerophosphoinositol as a source of the nutrients inositol and phosphate; expression and transport rate are regulated by phosphate and inositol availability
YDL081C	-5,17	-10,7	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YDL130W_ex2	-5,89	-12,2	Ribosomal protein P1 beta, component of the ribosomal stalk, which is involved in interaction of translational elongation factors with ribosome; accumulation is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YOL039W	-5,97	-12,4	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YDR382W	-6,15	-12,8	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YDL130W_ex1	-6,74	-14,0	Ribosomal protein P1 beta, component of the ribosomal stalk, which is involved in interaction of translational elongation factors with ribosome; accumulation is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component

Tabla A.6. Resultados del análisis de traductoma de D4567/W303 hibridado en microarrays de Affymetrix YGS98. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

ORF	LogT	zs	Descripción
YNR074C	3,82	9,2	Mitochondrial cell death effector that translocates to the nucleus in response to apoptotic stimuli, homolog of mammalian Apoptosis-Inducing Factor, putative reductase
YLR411W	3,06	7,4	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, acts as a trimer; gene is disrupted by a Ty2 transposon insertion in many laboratory strains of <i>S. cerevisiae</i>
Q0185_ex6	2,96	7,1	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YGR122C-A	2,92	7,0	YGR122C-A hypothetical protein
YCL017C	2,65	6,4	Cysteine desulfurase involved in iron-sulfur cluster (Fe/S) biogenesis; required for the post-transcriptional thio-modification of mitochondrial and cytoplasmic tRNAs; essential protein located predominantly in mitochondria
YOR202W	2,48	6,0	Imidazoglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YOR203W	2,37	5,7	Imidazoglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YIL080W	2,01	4,8	TyB Gag-Pol protein; proteolytically processed to make the Gag, RT, PR, and IN proteins that are required for retrotransposition
YLR280C	1,85	4,5	YLR280C questionable ORF
YLR281C	1,70	4,1	Hypothetical ORF
YLR280C	1,68	4,0	Hypothetical ORF
YLR326W	1,59	3,8	Hypothetical ORF
YLR275W_ex2	1,54	3,7	U1 snRNP protein of the Sm class
YLR274W	1,53	3,7	Component of the hexameric MCM complex, which is important for priming origins of DNA replication in G1 and becomes an active ATP-dependent helicase that promotes DNA melting and elongation when activated by Cdc7p-Dbf4p in S-phase
YLR304C	1,47	3,5	Aconitase, required for the tricarboxylic acid (TCA) cycle and also independently required for mitochondrial genome maintenance; component of the mitochondrial nucleoid; mutation leads to glutamate auxotrophy
YLR239C	1,45	3,5	Lipoil ligase, involved in the modification of mitochondrial enzymes by the attachment of lipoic acid groups
YLR316C	1,39	3,3	tRNA-specific adenosine-34 deaminase subunit Tad3p
YLR247C	1,32	3,2	Hypothetical ORF
YLR327C	1,31	3,2	Hypothetical ORF

YLR228C	1,28	3,1	Sterol regulatory element binding protein, regulates transcription of the sterol biosynthetic genes ERG2 and ERG3; member of the fungus-specific Zn[2]-Cys[6] binuclear cluster family of transcription factors; homologous to Upc2p
YLR298C	1,27	3,0	U1 snRNP protein required for pre-mRNA splicing
YBR244W	1,26	3,0	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced by glucose starvation that protects cells from phospholipid hydroperoxides and nonphospholipid peroxides during oxidative stress
YLR243W	1,25	3,0	Protein required for cell viability
YLR265C	1,24	3,0	Protein involved in regulation of nonhomologous end joining; repressed by MAT heterozygosity; associates with Lif1p and regulates its cellular distribution
YGL212W	1,24	3,0	Regulator of vacuolar morphogenesis; hydrophilic protein, heptad repeat motif
Q0185_ex4	1,24	3,0	Subunit I of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
YLR328W	1,20	2,9	Nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase, involved in NAD(+) salvage pathway
YPL068C	1,20	2,9	Hypothetical ORF
YLR253W	1,18	2,8	Hypothetical ORF
YLR319C	1,18	2,8	Actin- and formin-interacting protein, involved in actin cable nucleation and polarized cell growth; isolated as bipolar budding mutant; potential Cdc28p substrate
YLR276C	1,16	2,8	ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in biogenesis of the 60S ribosomal subunit
YIR023W	1,15	2,8	Positive regulator of genes in multiple nitrogen degradation pathways; contains DNA binding domain but does not appear to bind the dodecanucleotide sequence present in the promoter region of many genes involved in allantoin catabolism
YMR069W	1,12	2,7	N alpha-acetyl-transferase, involved in acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A
YDR019C	1,11	2,7	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
YLR291C	1,10	2,6	Beta subunit of the translation initiation factor eIF2B, the guanine-nucleotide exchange factor for eIF2; activity subsequently regulated by phosphorylated eIF2; first identified as a negative regulator of GCN4 expression
YLR264W	1,10	2,6	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps28Bp and has similarity to rat S28 ribosomal protein
YLR330W	1,09	2,6	Protein of unknown function, involved in chitin biosynthesis by regulating Chs3p localization, also involved in cell fusion during mating
YLR270W	1,09	2,6	YLR270W strong similarity to YOR173w
YER137C	1,08	2,6	Hypothetical ORF
YLR336C	1,05	2,5	Essential nuclear protein with a possible role in the osmoregulatory glycerol response; interacts with phospholipase C (Plc1p); putative homolog of human NOM1 which is implicated in acute myeloid leukemia
YLR306W_ex2	1,04	2,5	Enzyme that mediates the conjugation of Rub1p, a ubiquitin-like protein, to other proteins; related to E2 ubiquitin-conjugating enzymes
YLR262C-A	1,04	2,5	Similar to C. elegans protein
YDR200C	1,04	2,5	YDR200C similarity to hypothetical protein YLR238w
YKR022C	1,04	2,5	Protein required for cell viability
YLR277C	1,04	2,5	subunit of Polyadenylation factor I (PF I)
YLR237W	1,03	2,5	Plasma membrane transporter responsible for the uptake of thiamine, member of the major facilitator superfamily of transporters; mutation of human ortholog causes thiamine-responsive megaloblastic anemia
YLR073C	1,03	2,5	Hypothetical ORF
YLR289W	1,03	2,5	Mitochondrial GTPase of unknown function, similar to E. coli elongation factor-type GTP-binding protein LepA and to LK1236.1 from Caenorhabditis elegans
YGR031W	1,03	2,5	Hypothetical ORF
YFL021c-a	1,03	2,5	YFL021c-a hypothetical protein
YLR257W	1,03	2,5	Hypothetical ORF
YLR323C	1,01	2,4	Essential protein, component of a complex containing Cef1p; has similarity to S. pombe Cwf24p
YGR138C	1,01	2,4	YGR138C similarity to multidrug resistance proteins
YLR309C	1,00	2,4	Protein involved in vesicular transport, mediates transport between an endosomal compartment and the Golgi, contains a Golgi-localization (GRIP) domain that interacts with activated Arl1p-GTP to localize Imh1p to the Golgi
YPL113C	-1,00	-2,4	Putative dehydrogenase
YDR135C	-1,01	-2,5	Vacuolar glutathione S-conjugate transporter of the ATP-binding cassette family, has a role in detoxifying metals such as cadmium, mercury, and arsenite; also transports unconjugated bilirubin; similar to human cystic fibrosis protein CFTR
YMR173W-A	-1,01	-2,5	YMR173W-A questionable ORF
YKR034W	-1,01	-2,5	Negative regulator of genes in multiple nitrogen degradation pathways; expression is regulated by nitrogen levels and by Gln3p; member of the GATA-binding family, forms homodimers and heterodimers with Deh1p
YLR092W	-1,03	-2,5	High affinity sulfate permease; sulfate uptake is mediated by specific sulfate transporters Sul1p and Sul2p, which control the concentration of endogenous activated sulfate intermediates
YIL113W	-1,04	-2,5	Stress-inducible dual-specificity MAP kinase phosphatase, negatively regulates Slk2p MAP kinase by direct dephosphorylation, diffuse localization under normal conditions shifts to punctate localization after heat shock
YNL274C	-1,05	-2,6	Putative hydroxyisocaproate dehydrogenase

YLR142W	-1,05	-2,6	Proline oxidase, nuclear-encoded mitochondrial protein involved in utilization of proline as sole nitrogen source; PUT1 transcription is induced by Put3p in the presence of proline and the absence of a preferred nitrogen source
YJR153W	-1,05	-2,6	Endo-polygalacturonase, pectolytic enzyme that hydrolyzes the alpha-1,4-glycosidic bonds in the rhamnogalacturonan chains in pectins
YDR253C	-1,06	-2,6	Zinc-finger DNA-binding protein, involved in regulating expression of the methionine biosynthetic genes, similar to Met31p
YKR011C	-1,06	-2,6	Hypothetical ORF
YLL052C	-1,09	-2,6	Water channel that mediates the transport of water across cell membranes and may be involved in freeze tolerance; disrupted by a stop codon in many <i>S. cerevisiae</i> strains
YBR047W	-1,09	-2,7	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
YOR173W	-1,11	-2,7	Non-essential protein containing a HIT (histidine triad) motif; regulated by Msn2p, Msn4p, and the Ras-cAMP-cAPK signaling pathway, transcript accumulates under glucose limitation, similar to Dcs1p
YBR147W	-1,12	-2,7	Hypothetical ORF
YJL212C	-1,12	-2,7	Plasma membrane transporter that transports tetra- and pentapeptides and glutathione; member of the OPT family
YMR038C	-1,13	-2,7	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p, involved in oxidative stress protection; Met-X-Cys-X2-Cys motif within the N-terminal portion is involved in insertion of copper into Sod1p under conditions of copper deprivation
YDR516C	-1,13	-2,7	Non-essential protein of unknown function required for transcriptional induction of the early meiotic-specific transcription factor IME1, also required for sporulation
YKR093W	-1,14	-2,8	Integral membrane peptide transporter, mediates transport of di- and tri-peptides; conserved protein that contains 12 transmembrane domains; PTR2 expression is regulated by the N-end rule pathway via repression by Cup9p
YIL074C	-1,14	-2,8	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser3p
YGR161C	-1,15	-2,8	Putative component of the protein phosphatase type 2A complex
YPL092W	-1,15	-2,8	Plasma membrane sulfite pump involved in sulfite metabolism and required for efficient sulfite efflux; major facilitator superfamily protein
YKR069W	-1,16	-2,8	S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylese, involved in sulfate assimilation, methionine metabolism, and siroheme biosynthesis
YIR030C	-1,17	-2,9	Protein of unknown function, expression is sensitive to nitrogen catabolite repression and regulated by Dal80p; contains transmembrane domain
YMR105C	-1,18	-2,9	Phosphoglucosyltransferase, catalyzes the conversion from glucose-1-phosphate to glucose-6-phosphate, which is a key step in hexose metabolism; functions as the acceptor for a Glc-phosphotransferase
YER042W	-1,18	-2,9	Peptide methionine sulfoxide reductase, reverses the oxidation of methionine residues; involved in oxidative damage repair, providing resistance to oxidative stress and regulation of lifespan
YER072W	-1,18	-2,9	Protein involved in vacuolar maintenance
YMR318C	-1,19	-2,9	NADPH-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase family member with broad substrate specificity; may be involved in fusel alcohol synthesis or in aldehyde tolerance
YLL053C	-1,19	-2,9	Hypothetical ORF; maybe continuous with YLL052C (AQY2) in some strain backgrounds including Sigma1278b; functions as an aquaporin in these strains.
YGR233C	-1,19	-2,9	Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, regulates Pho80p-Pho85p and Pcl7p-Pho85p cyclin-CDK complexes in response to phosphate levels; required for derepression of PHO5; transcriptionally regulated by Pho4p and Pho2p
YER001W	-1,20	-2,9	Alpha-1,3-mannosyltransferase, integral membrane glycoprotein of the Golgi complex, required for addition of alpha1,3-mannose linkages to N-linked and O-linked oligosaccharides, one of five <i>S. cerevisiae</i> proteins of the MNN1 family
YEL060C	-1,20	-2,9	Vacuolar proteinase B (yscB), a serine protease of the subtilisin family; involved in protein degradation in the vacuole and required for full protein degradation during sporulation
YCL026C-A	-1,24	-3,0	Protein of unknown function, involved in the integration of lipid signaling pathways with cellular homeostasis
YDL169C	-1,26	-3,1	Protein of unknown function
YOR120W	-1,27	-3,1	Putative NADP(+) coupled glycerol dehydrogenase, proposed to be involved in an alternative pathway for glycerol catabolism
YJL060W	-1,27	-3,1	Arylformamidase, involved in biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan via kynurenine pathway; potential Cdc28p substrate
YNL241C	-1,29	-3,1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
YJR047C	-1,30	-3,2	Translation initiation factor eIF-5A, promotes formation of the first peptide bond; similar to and functionally redundant with Hyp2p; undergoes an essential hypusination modification; expressed under anaerobic conditions
YMR173W	-1,34	-3,3	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; contains multiple repeats of the amino acid sequence NNDSYGS
YCL025C	-1,37	-3,3	Low-affinity amino acid permease with broad substrate range, involved in uptake of asparagine, glutamine, and other amino acids; expression is regulated by the SPS plasma membrane amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)
YJR025C	-1,41	-3,4	3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase, required for biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan via kynurenine pathway
YIL167W	-1,42	-3,4	Hypothetical ORF
YFR015C	-1,46	-3,5	Glycogen synthase with similarity to Gsy2p, the more highly expressed yeast homolog; expression induced by glucose limitation, nitrogen starvation, environmental stress, and entry into stationary phase

YBR066C	-1,47	-3,6	Transcriptional repressor that mediates glucose repression and negatively regulates filamentous growth; has similarity to Nrg1p
YOR313C	-1,48	-3,6	Protein whose expression is induced during sporulation; not required for sporulation; heterologous expression in <i>E. coli</i> induces the SOS response that senses DNA damage
YBR050C	-1,49	-3,6	Protein that binds type 1 protein phosphatase Glc7p; involved with Reg1p, Glc7p, and Snf1p in regulation of glucose-repressible genes
YOL058W	-1,51	-3,7	Argininosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
YDR533C	-1,54	-3,7	Possible chaperone and cysteine protease with similarity to <i>E. coli</i> Hsp31 and <i>S. cerevisiae</i> Hsp32p, Hsp33p, and Sno4p; member of the DJ-1/ThiJ/Pfpl superfamily, which includes human DJ-1 involved in Parkinson's disease; exists as a dimer
YPR160W	-1,58	-3,8	Non-essential glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen, activity is regulated by cyclic AMP-mediated phosphorylation, expression is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway
YHL028W	-1,64	-4,0	cell wall integrity and stress response component 4; Putative integral membrane protein containing novel cysteine motif. Similarity to SLG1 (WSC1), WSC2 and WSC3
YER067W	-1,66	-4,0	Hypothetical ORF
YJL101C	-1,66	-4,0	Gamma glutamylcysteine synthetase, catalyzes the first step in the gamma-glutamyl cycle for glutathione (GSH) biosynthesis; expression induced by oxidants, cadmium, and mercury
YOL151W	-1,69	-4,1	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YPL274W	-1,72	-4,2	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YCL030C	-1,72	-4,2	Multifunctional enzyme containing phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase, phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, and histidinol dehydrogenase activities; catalyzes the second, third, ninth and tenth steps in histidine biosynthesis
YLR348C	-1,74	-4,2	Mitochondrial dicarboxylate carrier, integral membrane protein, catalyzes a dicarboxylate-phosphate exchange across the inner mitochondrial membrane, transports cytoplasmic dicarboxylates into the mitochondrial matrix
YLL062C	-1,76	-4,3	S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase, functions along with Sam4p in the conversion of S-adenosylmethionine (AdoMet) to methionine to control the methionine/AdoMet ratio
YDL021W	-1,81	-4,4	Homolog of Gpm1p phosphoglycerate mutase which converts 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate in glycolysis; may be non-functional derivative of a gene duplication event
YHR029C	-1,85	-4,5	Hypothetical ORF
YML116W	-1,87	-4,5	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily, required for resistance to aminotriazole and 4-nitroquinoline-N-oxide
YJR079W_ex1	-1,87	-4,5	Hypothetical ORF
YLR303W	-1,88	-4,6	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YBR157C	-1,89	-4,6	Protein of unknown function; null mutation does not confer any obvious defects in growth, spore germination, viability, or carbohydrate utilization
YDL243C	-1,90	-4,6	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YJR137C	-1,92	-4,7	Sulfite reductase beta subunit, involved in amino acid biosynthesis, transcription repressed by methionine
YJL012C	-1,93	-4,7	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YIR017C	-1,94	-4,7	Transcriptional activator in the Cbf1p-Met4p-Met28p complex, participates in the regulation of sulfur metabolism
YML131W	-1,95	-4,7	Hypothetical ORF
YDR481C	-1,97	-4,8	Repressible alkaline phosphatase, a glycoprotein localized to the vacuole; regulated by levels of inorganic phosphate and by a system consisting of Pho4p, Pho9p, Pho80p, Pho81p and Pho85p; dephosphorylates phosphotyrosyl peptides
YPR167C	-1,97	-4,8	3'-phosphoadenylylsulfate reductase, reduces 3'-phosphoadenylyl sulfate to adenosine-3',5'-bisphosphate and free sulfite using reduced thioredoxin as cosubstrate, involved in sulfate assimilation and methionine metabolism
YNL134C	-2,02	-4,9	YNL134C similarity to <i>C. carbonum</i> toxD gene
YKL071W	-2,04	-4,9	Hypothetical ORF
YER091C	-2,08	-5,0	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase
YDL124W	-2,12	-5,1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase; reduces aromatic alpha-keto amides, aliphatic alpha-keto esters, and aromatic alpha-keto esters
YFR030W	-2,18	-5,3	Subunit alpha of assimilatory sulfite reductase, which is responsible for the conversion of sulfite into sulfide
YBR072W	-2,18	-5,3	Small heat shock protein with chaperone activity that is regulated by a heat induced transition from an inactive oligomeric (24-mer) complex to an active dimer; induced by heat, upon entry into stationary phase, and during sporulation
YJL052W	-2,19	-5,3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
YGL089C	-2,19	-5,3	Mating pheromone alpha-factor, made by alpha cells; interacts with mating type a cells to induce cell cycle arrest and other responses leading to mating; also encoded by MF(ALPHA)1, which is more highly expressed than MF(ALPHA)2
YKL103C	-2,22	-5,4	Vacuolar aminopeptidase, often used as a marker protein in studies of autophagy and cytosol to vacuole targeting (CVT) pathway

YKR076W	-2,22	-5,4	Non-essential protein of unknown function; similar to Ygr154cp
YMR090W	-2,23	-5,4	Hypothetical ORF
YFL021W	-2,25	-5,5	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression, member of the GATA family of DNA binding proteins; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p
YGL009C	-2,26	-5,5	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YKL120W	-2,27	-5,5	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YJR078W	-2,27	-5,5	Tryptophan 2,3-dioxygenase, required for biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan via kynurenine pathway
YNL142W	-2,33	-5,6	Ammonium permease involved in regulation of pseudohyphal growth; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH ₄ ⁺); expression is under the nitrogen catabolite repression regulation
YOR348C	-2,33	-5,7	Proline permease, required for high-affinity transport of proline; also transports the toxic proline analog azetidine-2-carboxylate (AzC); PUT4 transcription is repressed in ammonia-grown cells
YGL184C	-2,37	-5,7	Cystathionine beta-lyase, converts cystathionine into homocysteine
YIR032C	-2,40	-5,8	Ureidoglycolate hydrolase, converts ureidoglycolate to glyoxylate and urea in the third step of allantoin degradation; expression sensitive to nitrogen catabolite repression
YER081W	-2,43	-5,9	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser33p
YKL001C	-2,48	-6,0	Adenylylsulfate kinase, required for sulfate assimilation and involved in methionine metabolism
YNR034w-a	-2,52	-6,1	Hypothetical ORF
YJR010W	-2,57	-6,2	ATP sulfurylase, catalyzes the primary step of intracellular sulfate activation, essential for assimilatory reduction of sulfate to sulfide, involved in methionine metabolism
YPL019C	-2,59	-6,3	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YFL056C	-2,66	-6,5	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YER037W	-3,04	-7,4	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YAR071W	-3,05	-7,4	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YPR194C	-3,05	-7,4	Oligopeptide transporter; member of the OPT family, with potential orthologs in <i>S. pombe</i> and <i>C. albicans</i>
YNL277W	-3,20	-7,7	L-homoserine-O-acetyltransferase, catalyzes the conversion of homoserine to O-acetyl homoserine which is the first step of the methionine biosynthetic pathway
YFL057C	-3,24	-7,9	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YCR098C	-3,32	-8,0	Plasma membrane permease, mediates uptake of the phosphatidylinositol metabolite glycerophosphoinositol as a source of the nutrients inositol and phosphate; expression and transport rate are regulated by phosphate and inositol availability
YBR093C	-3,49	-8,5	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YPL171C	-3,76	-9,1	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with slight differences in ligand binding and catalytic properties; may be involved in sterol metabolism
YDR281C	-3,90	-9,5	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels
YLL060C	-4,06	-9,8	Glutathione S-transferase capable of homodimerization; functional overlap with Gtt2p, Grx1p, and Grx2p
YKR039W	-4,24	-10,3	General amino acid permease; localization to the plasma membrane is regulated by nitrogen source
YDL130W_ex2	-4,75	-11,5	Ribosomal protein P1 beta, component of the ribosomal stalk, which is involved in interaction of translational elongation factors with ribosome; accumulation is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YML123C	-4,77	-11,6	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YDL081C	-4,84	-11,7	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YOL039W	-4,93	-11,9	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YHR136C	-4,99	-12,1	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors, overproduction suppresses a plc1 null mutation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YDR382W	-5,10	-12,4	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YDL130W_ex1	-5,93	-14,4	Ribosomal protein P1 beta, component of the ribosomal stalk, which is involved in interaction of translational elongation factors with ribosome; accumulation is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component

Tabla A.7. Resultados del análisis de transcriptoma de D46/W303 hibridado en microarrays de oligonucleótidos YG1.1. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

Orf	LogT	zs	Description
Q0075	4,84	8,4	Protein of unknown function, encoded within an intron of the mitochondrial COX1 gene; translational initiation codon is predicted to be ATA rather than ATG
Q0070	3,53	7,3	Endonuclease I-SceIV, involved in intron mobility; encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YFL026W	3,27	6,6	alpha-factor pheromone receptor; seven-transmembrane domain protein
YCR097W	3,16	4,9	Silenced copy of A1, encoding a homeobox-domain containing corepressor that interacts with Alpha2p to repress haploid-specific gene transcription in diploid cells
YNL145W	2,91	5,9	lipopeptide mating pheromone; mating a-factor pheromone precursor
YCL064C	2,61	5,0	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YGL032C	2,61	5,5	Adhesion subunit of a-agglutinin of a-cells, C-terminal sequence acts as a ligand for alpha-agglutinin (Sag1p) during agglutination, modified with O-linked oligomannosyl chains, linked to anchorage subunit Aga1p via two disulfide bonds
YDR461W	2,34	4,7	a-factor mating pheromone precursor
YFL014W	2,32	4,8	Plasma membrane localized protein that protects membranes from dessication; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YKL209C	2,10	3,5	ABC transporter, glycoprotein, component of a-factor secretory pathway
YMR107W	1,96	2,5	Protein required for survival at high temperature during stationary phase; not required for growth on nonfermentable carbon sources
Q0060	1,95	4,3	Endonuclease I-SceIII, encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YMR196W	1,94	2,5	---
YBR100W	1,91	2,5	---
YOL084W	1,88	2,5	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery and vacuole
YLR223C	1,83	2,4	Essential protein with a highly acidic N-terminal domain; IFH1 exhibits genetic interactions with FHL1, overexpression interferes with silencing at telomeres and HM loci; potential Cdc28p substrate
YBR152W	1,82	2,5	Suppressor of Pre-mRNA Processing mutant; U4/U6.U5-associated snRNP protein; contains a PEST proteolysis motif
YHR041C	1,81	2,4	RNA polymerase II holoenzyme/mediator subunit
YGR179C	1,76	2,3	Outer kinetochore protein, required for accurate mitotic chromosome segregation; forms a complex with Mcm21p and Okp1p that binds to centromeres via the CBF3 complex
YCL021W-A	1,74	2,8	---
YKR064W	1,73	2,2	---
YMR175W	1,72	2,6	Protein whose expression is induced by salt
YNL148C	1,71	2,5	alpha-tubulin foldin; protein implicated in folding of alpha tubulin; cofactor B
YJR052W	1,70	3,5	Protein that recognizes and binds damaged DNA in an ATP-dependent manner (with Rad16p) during nucleotide excision repair; subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 4 (NEF4)
YKR017C	1,70	2,2	---
YNL136W	1,69	2,2	Subunit of the NuA4 histone acetyltransferase complex
YIL024C	1,69	2,1	---
YJL184W	1,69	2,2	Protein of unknown function, proposed to be involved in the transfer of mannosylphosphate groups onto N-linked oligosaccharides; also proposed to be involved in responding to osmotic stress
YKR063C	1,68	2,2	Essential nuclear protein possibly involved in bud formation and morphogenesis; mutants require the SSD1-v allele for viability
YKL023W	1,67	2,1	---
YPL186C	1,65	2,1	Protein of unknown function
YML062C	1,63	2,1	Protein involved in mitochondrial import of fusion proteins; mitochondrial targeting protein
YHL010C	1,63	2,5	---
YKR022C	1,63	2,8	---
YLR273C	1,62	2,4	Putative type 1 phosphatase regulatory subunit; interacts with Gsy2p; Protein similar to Gac1p, a putative type 1 protein phosphatase targeting subunit
YAL061W	1,61	2,2	---
YDR163W	1,61	2,0	Non-essential protein involved in pre-mRNA splicing, component of a complex containing Cef1p; has similarity to S. pombe Cwf15p
YMR020W	1,59	2,1	Polyamine oxidase, converts spermine to spermidine, which is required for the essential hypusination modification of translation factor eIF-5A; also involved in pantothenic acid biosynthesis
YPL223C	1,58	2,2	Hydrophilin of unknown function; stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YBR296C	1,56	3,3	Na+/Pi cotransporter, active in early growth phase; similar to phosphate transporters of Neurospora crassa; transcription regulated by inorganic phosphate concentrations and Pho4p
YLR281C	1,54	2,0	---
YJR076C	1,52	2,0	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is required for cytokinesis; septins recruit proteins to the neck and can act as a barrier to diffusion at the membrane, and they comprise the 10nm filaments seen with EM

YGL029W	1,52	2,8	Coiled-coil protein that may contribute to compartmentalization of nucleolar constituents; expression is growth-regulated
YMR174C	1,51	2,0	Cytoplasmic proteinase A inhibitor, dependent on Pbs2p and Hog1p protein kinases for osmotic induction; intrinsically unstructured, N-terminal half becomes ordered in the active site of proteinase A upon contact
YKR023W	1,49	2,4	---
YOL112W	1,49	3,1	GTPase-activating protein of the Ras superfamily that acts primarily on Sec4p, localizes to the bud site and bud tip, has similarity to Msb3p; msb3 msb4 double mutation causes defects in secretion and actin organization
YLL008W	1,47	2,0	Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits
YDL243C	1,47	2,0	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YMR311C	1,46	2,0	Regulatory subunit of protein phosphatase 1 (Glc7p), involved in glycogen metabolism and chromosome segregation; proposed to regulate Glc7p activity via conformational alteration; ortholog of the mammalian protein phosphatase inhibitor 2
YMR240C	1,45	2,1	Protein required for assembly of U2 snRNP into the spliceosome, forms a complex with Hsh49p and Hsh155p
YMR269W	1,44	2,2	---
YNR054C	1,44	2,0	Protein required for cell viability
YDR359C	1,42	2,1	Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex
YKL163W	1,41	3,1	Protein containing tandem internal repeats
YNL075W	1,40	2,4	Component of the SSU processome, which is required for pre-18S rRNA processing; interacts with Mpp10p; member of a superfamily of proteins that contain a sigma(70)-like motif and associate with RNAs
YJR103W	1,40	2,0	Last step in pyrimidine biosynthesis pathway; CTP synthase
YPL263C	1,38	2,0	Cytoplasmic protein of unknown function
YDR043C	1,38	3,0	Transcriptional repressor that recruits the Cyc8p-Tup1p complex to promoters; mediates glucose repression and negatively regulates a variety of processes including filamentous growth and alkaline pH response
YOL108C	1,36	2,8	Transcription factor required for derepression of inositol-choline-regulated genes involved in phospholipid synthesis; forms a complex, with Ino2p, that binds the inositol-choline-responsive element through a basic helix-loop-helix domain
YKL143W	1,36	2,1	Protein required for growth at low temperature
YCR032W	1,35	2,5	Protein homologous to human Chediak-Higashi syndrome protein and murine beige gene, which are implicated in disease syndromes due to defective lysosomal trafficking
YPL275W	1,34	2,0	---
YBR071W	1,34	2,9	---
YLR142W	1,33	2,8	proline oxidase
YKR091W	1,33	2,3	Cytoplasmic protein that, when overexpressed, suppresses the lethality of a rad53 null mutation; potential Cdc28p substrate
YPL209C	1,31	2,4	Aurora kinase involved in regulating kinetochore-microtubule attachments, associates with Sli5p, which stimulates Ipl1p kinase activity and promotes its association with the mitotic spindle, potential Cdc28p substrate
YOR202W	1,27	2,5	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YPL212C	1,25	2,1	Involved in tRNA biogenesis; intranuclear protein which exhibits a nucleotide-specific intron-dependent tRNA pseudouridine synthase activity
YGR082W	1,25	2,0	Translocase of Outer Mitochondrial membrane; 20 kDa mitochondrial outer membrane protein import receptor
YGR086C	1,22	2,8	Long chain base-responsive inhibitor of protein kinases Phk1p and Phk2p, acts along with Lsp1p to down-regulate heat stress resistance via regulation of the Pkc1p and Ypk1p pathways; phosphorylated by Phk1p and Phk2p
YDR111C	1,22	2,7	putative alanine transaminase (glutamyl pyruvic transaminase)
YOL027C	1,22	2,3	Mitochondrial Distribution and Morphology
YFR001W	1,21	2,5	Nuclear protein involved in asymmetric localization of ASH1 mRNA; binds double-stranded RNA in vitro
YBR072W	1,21	2,6	Small heat shock protein with chaperone activity that is regulated by a heat induced transition from an inactive oligomeric (24-mer) complex to an active dimer; induced by heat, upon entry into stationary phase, and during sporulation
YGR031W	1,21	2,1	---
YOR249C	1,20	2,0	Subunit of the Anaphase Promoting Complex; all known APC subunits co-immunoprecipitate with epitope-tagged Apc5; subunit of the anaphase promoting complex
YGR248W	1,19	2,0	Protein with similarity to Sol3p
YOR222W	1,18	2,5	Mitochondrial inner membrane transporter, exports 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate from the mitochondrial matrix to the cytosol for use in lysine and glutamate biosynthesis and in lysine catabolism
YEL021W	1,18	2,5	orotidine-5'-phosphate decarboxylase
YKL220C	1,18	2,0	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bound iron and oxidized copper prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels but not by low copper levels
YPL151C	1,18	2,0	Splicing factor that is found in the Cef1p subcomplex of the spliceosome
YLR316C	1,16	2,2	tRNA-specific adenosine-34 deaminase subunit Tad3p
YER077C	1,16	2,4	---
YER085C	1,15	2,3	---

YOL015W	1,14	2,3	---
YIR029W	1,14	2,1	Allantoicase, converts allantoate to urea and ureidoglycolate in the second step of allantoin degradation; expression sensitive to nitrogen catabolite repression and induced by allophanate, an intermediate in allantoin degradation
YMR169C	1,12	2,3	Aldehyde dehydrogenase that uses NAD ⁺ as the preferred coenzyme; expression is induced in response to heat shock, oxidative, and osmotic stress
YPL111W	1,12	2,3	arginase
YDL204W	1,11	2,1	reticulon gene member of the RTNLA (reticulon-like A) subfamily
YCR036W	1,11	2,3	ribokinase
YER127W	1,10	2,3	Essential protein involved in maturation of 18S rRNA; depletion leads to inhibited pre-rRNA processing and reduced polysome levels; localizes primarily to the nucleolus
YOR006C	1,10	2,3	---
YDR082W	1,08	2,2	Protein involved in telomere length regulation; functions in telomere metabolism during late S phase
YLR438C-A	1,08	2,1	Component of small nuclear ribonucleoprotein complexes involved in RNA processing, splicing, and decay
YAL053W	1,08	2,1	---
YKR019C	1,07	2,0	Protein involved in regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate concentrations; Lrs4p and Tax4p bind and activate the phosphatase Inp51p; mutation confers an increase in rDNA silencing
YPR163C	1,06	2,2	Suppressor of translation mutants; Translation initiation factor eIF-4B
YER126C	1,06	2,2	Constituent of 66S pre-ribosomal particles, involved in 60S ribosomal subunit biogenesis
YDR478W	1,06	2,1	Subunit of RNase MRP, which cleaves pre-rRNA; not shared between RNase MRP and nuclear RNase P, in contrast to all other RNase MRP protein subunits; binds to the NME1 RNA subunit of RNase MRP
YDL025C	1,05	2,1	---
YGR262C	1,05	2,2	Protein involved in bud-site selection; diploid mutants display a random budding pattern instead of the wild-type bipolar pattern
YCR086W	1,05	2,3	Protein that forms a complex with Lrs4p, located in the nucleolus; Lrs4p-Csm1p heterodimer binds to Mam1p at kinetochores during meiosis I to mediate accurate chromosome segregation, may be involved in premeiotic DNA replication
YDR433W	1,04	2,3	---
YNL292W	1,02	2,0	catalyzes formation of Psi55 (modified uridine) in mitochondrial and cytoplasmic tRNAs; Pseudouridine synthase
YNR072W	1,02	2,1	Protein of unknown function with similarity to hexose transporter family members, expression is repressed by high levels of glucose
YML101C-A	1,01	2,1	---
YLR421C	1,01	2,1	Subunit of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome lid
YLR221C	1,01	2,1	Protein with a likely role in ribosomal maturation, required for accumulation of wild-type levels of large (60S) ribosomal subunits; binds to the helicase Dbp6p in pre-60S ribosomal particles in the nucleolus
YCR020C	1,01	2,1	Protein required for respiratory growth and stability of the mitochondrial genome
YIL143C	1,01	2,0	DNA helicase homolog; homolog of human XPBC, ERCC3
YLR021W	1,00	2,1	---
YPL142C	1,00	2,0	---
YAL030W	1,00	2,1	Involved in mediating targeting and transport of secretory proteins; forms a complex with Snc2p and Sec9p; homolog of Snc2p, vesicle-associated membrane protein (synaptobrevin) homolog, forms a complex with Snc2p and Sec9p
YKR088C	-1,04	-2,0	Integral membrane protein localized to vesicles along with the v-SNARE Tlg2p; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YLR454W	-1,09	-2,1	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
YCR094W	-1,09	-2,0	Endosomal protein that regulates cell polarity; similar to Ynr048wp and Lem3p
YDL035C	-1,12	-2,1	Plasma membrane G-protein coupled receptor that interacts with the heterotrimeric G protein alpha subunit, Gpa2p, and with Plc1p; sensor that integrates nutritional signals with the modulation of cell fate via PKA and cAMP synthesis
YLR064W	-1,18	-2,0	---
YMR173W	-1,19	-2,0	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; contains multiple repeats of the amino acid sequence NNDSYGS
YBR229C	-1,24	-2,0	Glucosidase II catalytic subunit required for normal cell wall synthesis; mutations in rot2 suppress tor2 mutations, and are synthetically lethal with rot1 mutations
YMR266W	-1,25	-2,5	Overexpression rescues sro7/sop1 in NaCl. Encodes a membrane protein.
YJL062W	-1,25	-2,1	Integral plasma membrane protein involved in the synthesis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure; mutations affect cell wall integrity
YMR006C	-1,26	-2,2	Phospholipase B 2; lysophospholipase/phospholipase B
YBR139W	-1,28	-2,1	---
YJR015W	-1,28	-2,2	---
YBR205W	-1,32	-2,0	Putative alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O- and N-linked protein glycosylation; member of the KRE2/MNT1 mannosyltransferase family
YHR028C	-1,32	-2,2	Dipeptidyl aminopeptidase, synthesized as a glycosylated precursor; localizes to the vacuolar membrane; similar to Ste13p
YDR452W	-1,36	-2,1	Vacuolar endopolyphosphatase with a role in phosphate metabolism; functions as a homodimer
YNL296W	-1,39	-2,3	---
YIL039W	-1,42	-2,3	---
YBR206W	-1,44	-2,1	---

YNL317W	-1,47	-2,4	Integral subunit of the pre-mRNA cleavage and polyadenylation factor (CPF) complex; plays an essential role in mRNA 3'-end formation by bridging different processing factors and thereby promoting the assembly of the processing complex
YBL005W-A	-1,47	-2,9	---
YOR099W	-1,50	-2,0	Alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O- and N-linked protein glycosylation; member of the KRE2/MNT1 mannosyltransferase family
YOL058W	-1,51	-2,3	Arginosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
YHR092C	-1,57	-2,6	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
YCR024C-A	-1,58	-2,7	May regulate plasma membrane H(+)-ATPase; Proteolipid associated with plasma membrane H(+)-ATPase (Pma1p)
YJL034W	-1,58	-2,1	ATPase involved in protein import into the ER, also acts as a chaperone to mediate protein folding in the ER and may play a role in ER export of soluble proteins; regulates the unfolded protein response via interaction with Ire1p
YNL288W	-1,59	-2,7	Evolutionarily conserved subunit of the CCR4-NOT complex involved in controlling mRNA initiation, elongation and degradation; binds Cdc39p
YLR312W-A	-1,59	-2,6	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YEL017C-A	-1,60	-2,8	May regulate plasma membrane H(+)-ATPase; nearly identical to PMP1; Proteolipid associated with plasma membrane H(+)-ATPase (Pma1p)
YDR135C	-1,61	-2,2	Vacuolar glutathione S-conjugate transporter of the ATP-binding cassette family, has a role in detoxifying metals such as cadmium, mercury, and arsenite; also transports unconjugated bilirubin; similar to human cystic fibrosis protein CFTR
YGL088W	-1,62	-2,7	---
YDR261C-D	-1,63	-2,4	---
YBR008C	-1,68	-2,7	Plasma membrane multidrug transporter, member of the major facilitator superfamily; involved in efflux of fluconazole, diazaborine, benomyl, methotrexate, and other drugs
Q0140	-1,72	-2,8	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, mitochondrially-encoded; polymorphic in different strains due to variation in number of AAT (asparagine) codons; translated near the mitochondrial inner membrane
YKL073W	-1,75	-2,3	Molecular chaperone of the endoplasmic reticulum lumen, involved in polypeptide translocation and folding; member of the Hsp70 family; localizes to the lumen of the ER; regulated by the unfolded protein response pathway
YML130C	-1,82	-2,3	Glycoprotein required for oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum
YNL134C	-1,94	-2,2	---
YPL274W	-1,95	-2,7	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YDR518W	-1,99	-3,5	Protein disulfide isomerase of the endoplasmic reticulum lumen, function overlaps with that of Pdi1p; may interact with nascent polypeptides in the ER
YLR040C	-2,14	-3,3	---
YJR148W	-2,23	-3,1	Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase, homolog of murine ECA39; highly expressed during stationary phase and repressed during logarithmic phase
YLR035C-A	-2,44	-2,5	---
YDL130W	-2,53	-2,9	Ribosomal protein P1 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YJR004C	-2,77	-4,5	Alpha-agglutinin of alpha-cells, binds to Aga1p during agglutination, N-terminal half is homologous to the immunoglobulin superfamily and contains binding site for alpha-agglutinin, C-terminal half is highly glycosylated and contains GPI anchor
YOL039W	-3,63	-4,0	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YGL089C	-3,81	-6,5	alpha mating factor
YPL187W	-4,01	-4,2	mating factor alpha
YKL178C	-4,83	-9,7	Cell surface a factor receptor, transcribed in alpha cells and required for mating by alpha cells, couples to a MAP kinase cascade to mediate pheromone response; ligand bound receptors undergo endocytosis and recycling to the plasma membrane
Q0080	-5,24	-9,9	Subunit 8 of the F0 sector of mitochondrial inner membrane F1-F0 ATP synthase, encoded on the mitochondrial genome
Q0085	-6,92	-11,2	Mitochondrially encoded subunit 6 of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis

Tabla A.8. Resultados del análisis de traductoma de D46/W303 hibridado en microarrays de oligonucleótidos YG1.1. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

ORF	LogT	zs	Description
YNL145W	4,20	6,8	lipopeptide mating pheromone; mating a-factor pheromone precursor
Q0075	4,05	7,1	Protein of unknown function, encoded within an intron of the mitochondrial COX1 gene; translational initiation codon is predicted to be ATA rather than ATG
YFL026W	4,04	7,1	alpha-factor pheromone receptor; seven-transmembrane domain protein
YCR097W	3,92	5,3	Silenced copy of A1, encoding a homeobox-domain containing corepressor that interacts with Alpha2p to repress haploid-specific gene transcription in diploid cells

YDR461W	3,16	5,5	a-factor mating pheromone precursor
YMR011W	2,90	4,7	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
YFL014W	2,83	3,4	Plasma membrane localized protein that protects membranes from dessication; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YKL209C	2,76	4,2	ABC transporter, glycoprotein, component of a-factor secretory pathway
YCL021W-A	2,63	3,9	---
YMR175W	2,59	3,7	Protein whose expression is induced by salt
YGL032C	2,52	3,5	Adhesion subunit of a-agglutinin of a-cells, C-terminal sequence acts as a ligand for alpha-agglutinin (Sag1p) during agglutination, modified with O-linked oligomannosyl chains, linked to anchorage subunit Aga1p via two disulfide bonds
YPL223C	2,40	3,1	Hydrophilin of unknown function; stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YER145C	2,37	3,4	High affinity iron permease involved in the transport of iron across the plasma membrane; forms complex with Fet3p; expression is regulated by iron
YPR149W	2,35	2,9	Protein of unknown function; contains transmembrane domains; involved in secretion of proteins that lack classical secretory signal sequences; component of the detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (DIGs)
YCL064C	2,27	4,3	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YDR077W	2,18	2,6	Isolated as a suppressor of an erd2 deletion mutant (ERD2 is the HDEL receptor that sorts ER proteins), SED1 encodes a cell wall protein.
YOR302W	1,97	3,3	---
YMR196W	1,91	2,5	---
YJR127C	1,91	2,5	Zinc-finger protein that localizes to the nucleus, putative transcriptional regulator of ALD6
YML128C	1,87	3,3	Protein of unknown function, green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the endoplasmic reticulum; msc1 mutants are defective in directing meiotic recombination events to homologous chromatids
YPL141C	1,87	2,4	---
YOR102W	1,86	2,5	---
YIL169C	1,86	3,2	---
YDR210C-D	1,83	2,0	---
YPL135W	1,82	3,3	Conserved protein of the mitochondrial matrix, performs a scaffolding function during assembly of iron-sulfur clusters, interacts physically and functionally with yeast frataxin (Yfh1p); isu1 isu2 double mutant is inviable
YOR343C-B	1,81	2,0	---
YNL190W	1,80	3,1	---
YDR034C-D	1,79	2,0	---
YOR222W	1,79	2,6	Mitochondrial inner membrane transporter, exports 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate from the mitochondrial matrix to the cytosol for use in lysine and glutamate biosynthesis and in lysine catabolism
YHR080C	1,78	2,5	---
YLR327C	1,78	3,2	Hypothetical ORF
YAL061W	1,76	2,3	---
YMR200W	1,73	3,2	Protein that may be involved in cell wall function; mutations in rot1 cause cell wall defects, suppress tor2 mutations, and are synthetically lethal with rot2 mutations
YER037W	1,73	2,8	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YLR106C	1,72	3,1	Midasin, pseudo-hexameric assembly of AAA protomers associated with a C-terminal MIDAS-containing M-domain, associated with 60S pre-ribosomes (large subunit precursor) and their export from the nucleus
YDR261W-B	1,72	2,1	---
YIR044C	1,71	2,5	---
YPL162C	1,70	2,4	---
YBR199W	1,70	3,0	Putative mannosyltransferase involved in protein glycosylation; member of the KRE2/MNT1 mannosyltransferase family
YLR361C	1,69	2,2	Protein involved in cell cycle regulation
YKL163W	1,69	3,1	Protein containing tandem internal repeats
YIL024C	1,68	2,2	---
YPL163C	1,68	3,0	Cell wall and vacuolar protein, required for wild-type resistance to vanadate
YNL198C	1,67	2,2	---
YMR136W	1,67	2,2	Protein containing GATA family zinc finger motifs; similar to Gln3p and Dal80p; expression repressed by leucine
YBR086C	1,67	2,7	Plasma membrane protein that may be involved in osmotolerance, localizes to the mother cell in small-budded cells and to the bud in medium- and large-budded cells; mRNA is transported to the bud tip by an actomysin-driven process
YGL228W	1,66	2,4	Putative glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein of unknown function; overexpression causes growth arrest
YKR022C	1,64	2,7	---
YHR007C	1,64	2,3	Lanosterol 14-alpha-demethylase, catalyzes the C-14 demethylation of lanosterol to form 4,4"-dimethyl cholesta-8,14,24-triene-3-beta-ol in the ergosterol biosynthesis pathway; member of the cytochrome P450 family
YBR296C	1,63	2,9	Na ⁺ /Pi cotransporter, active in early growth phase; similar to phosphate transporters of <i>Neurospora crassa</i> ; transcription regulated by inorganic phosphate concentrations and Pho4p
YMR107W	1,63	2,3	Protein required for survival at high temperature during stationary phase; not required for growth on nonfermentable carbon sources

YIL090W	1,62	2,6	---
YPL137C	1,61	2,3	---
YGR246C	1,61	2,2	TFIIB B-related factor, one of three subunits of RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIB, binds TFIIC and TBP and recruits RNA pol III to promoters, amino-terminal half is homologous to TFIIB
YGL012W	1,61	2,7	C-24(28) sterol reductase, catalyzes the final step in ergosterol biosynthesis; mutants are viable, but lack ergosterol
YMR031C	1,59	2,1	---
YPL186C	1,59	2,2	Protein of unknown function
YLR342W	1,59	2,8	Catalytic subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase, functionally redundant with alternate catalytic subunit Gsc2p; binds to regulatory subunit Rho1p; involved in cell wall synthesis and maintenance; localizes to sites of cell wall remodeling
YGR216C	1,58	2,3	Membrane protein involved in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol (GlcNAc-PI), the first intermediate in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors; human and mouse GPI1p are functional homologs
YOR149C	1,58	2,2	Protein involved in glycosyl phosphatidyl inositol synthesis, most likely an alpha 1,2 mannosyltransferase utilized for addition of the fourth, side-branching mannose onto the GPI core structure
YMR070W	1,58	2,3	Nuclear transcription factor with two Cys2-His2 zinc fingers; involved in repression of a subset of hypoxic genes by Rox1p, repression of several DAN/TIR genes during aerobic growth, and repression of ergosterol biosynthetic genes
YOR087W	1,57	2,0	Vacuolar cation channel, mediates release of Ca(2+) from the vacuole in response to hyperosmotic shock
YER173W	1,57	2,2	Checkpoint protein, involved in the activation of the DNA damage and meiotic pachytene checkpoints; subunit of a clamp loader that loads Rad17p-Mec3p-Ddc1p onto DNA; homolog of human and S. pombe Rad17 protein
YDR363W	1,57	2,2	Protein involved in mating-type locus silencing, interacts with Sir2p; probably functions to recruit or stabilize Sir proteins
YDR042C	1,56	2,2	---
YNL308C	1,55	2,1	Essential nucleolar protein required for 40S ribosome biogenesis; physically and functionally interacts with Krr1p
YBR286W	1,55	2,7	Vacuolar aminopeptidase Y, processed to mature form by Prb1p
YDL038C	1,54	2,0	---
YHR033W	1,54	2,8	---
YIL123W	1,53	2,8	(putative) involved in control of DNA replication
YCR013C	1,53	2,3	---
YPL018W	1,53	2,1	Outer kinetochore protein, required for accurate mitotic chromosome segregation; forms a complex with Mcm21p and Okp1p that binds to centromeres via the CBF3 complex
YOL088C	1,52	2,5	Member of the protein disulfide isomerase (PDI) family, exhibits chaperone activity; overexpression suppresses the lethality of a pdi1 deletion but does not complement all Pdi1p functions; undergoes oxidation by Ero1p
YFL048C	1,51	2,5	Integral membrane component of endoplasmic reticulum-derived COPII-coated vesicles, which function in ER to Golgi transport
YOR247W	1,51	2,7	Suppressor of rad53 null mutant lethality
YDR375C	1,51	2,3	Protein of the mitochondrial inner membrane that functions as an ATP-dependent chaperone, required for the assembly of the cytochrome bc(1) complex from the Rip1p and Qcr10p proteins; member of the CDC48/PAS1/SEC18 ATPase family
YOL155C	1,51	2,4	---
YGL226W	1,50	2,1	---
YMR297W	1,50	2,6	Vacuolar carboxypeptidase Y (proteinase C), involved in protein degradation in the vacuole and required for full protein degradation during sporulation
YMR296C	1,49	2,4	Component of serine palmitoyltransferase, responsible along with Lcb2p for the first committed step in sphingolipid synthesis, which is the condensation of serine with palmitoyl-CoA to form 3-ketosphinganine
YKR095W	1,47	2,0	Mlp proteins restrict telomere length by influencing the Rif1-Tel1 pathway of telomerase regulation; also involved in the translocation of macromolecules between the nucleoplasm and the NPC; coiled-coil protein (putative), similar to myosin and TPR
YBR162C	1,46	2,3	Target of SBF
YJL034W	1,45	2,6	ATPase involved in protein import into the ER, also acts as a chaperone to mediate protein folding in the ER and may play a role in ER export of soluble proteins; regulates the unfolded protein response via interaction with Ire1p
YPL057C	1,45	2,2	Probable catalytic subunit of a mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC) synthase, forms a complex with probable regulatory subunit Csg2p; function in sphingolipid biosynthesis is overlapping with that of Csh1p
YEL024W	1,45	2,3	oxidizes ubiquinol at center P in the protonmotive Q cycle mechanism, transferring one electron to cytochrome c1 and generating a low-potential ubisemiquinone anion which reduces the low-potential cytochrome b-566 heme group; Rieske iron-sulfur protein of the mitochondrial cytochrome bc1 complex
YML126C	1,44	2,0	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase, catalyzes the formation of HMG-CoA from acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA; involved in the second step in mevalonate biosynthesis
YLR276C	1,44	2,2	ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in biogenesis of the 60S ribosomal subunit
YDR233C	1,44	2,3	reticulon gene member of the RTNLA (reticulon-like A) subfamily
YGR046W	1,42	2,6	---
YBR117C	1,42	2,3	transketolase, homologous to tkl1
YLR120C	1,42	2,2	Aspartic protease, attached to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI)

			anchor
YEL045C	1,42	2,1	---
YNL158W	1,42	2,0	---
YPR125W	1,41	2,3	---
YML072C	1,41	2,4	Contains three calcium and lipid binding domains; localized to the bud; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery; mRNA is targeted to the bud via the mRNA transport system involving She2p; C-terminal portion of Tcb1p, Tcb2p and Tcb3p interact
YBR139W	1,41	2,8	---
YLR069C	1,41	2,2	mitochondrial elongation factor G-like protein
YFL031W	1,40	2,3	bZIP transcription factor (ATF/CREB1 homolog) that regulates the unfolded-protein response, via UPRE binding, and membrane biogenesis; ER stress-induced splicing pathway utilizing Ire1p, Trl1p and Ada5p facilitates efficient Hac1p synthesis
YKL165C-A	1,40	2,6	---
YGR282C	1,39	2,2	Endo-beta-1,3-glucanase, major protein of the cell wall, involved in cell wall maintenance
YDR098C-B	1,39	2,0	---
YLR056W	1,38	2,2	C-5 sterol desaturase, catalyzes the introduction of a C-5(6) double bond into episterol, a precursor in ergosterol biosynthesis; mutants are viable, but cannot grow on non-fermentable carbon sources
YPR198W	1,38	2,4	Member of drug-resistance protein family; multicopy suppressor of gal11 null mutation
YBL054W	1,37	2,0	---
YGR031W	1,36	2,3	---
YMR015C	1,36	2,1	C-22 sterol desaturase, a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain in ergosterol biosynthesis; may be a target of azole antifungal drugs
YDR524C	1,36	2,1	ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating protein (GAP) effector; ARF GAP with effector function(s)
YOR254C	1,35	2,1	Protein involved in protein import into ER; ER protein translocation subcomplex subunit
YOR220W	1,35	2,6	---
YHR039C	1,35	2,4	Protein of unknown function, green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the endoplasmic reticulum; msc7 mutants are defective in directing meiotic recombination events to homologous chromatids
YDR105C	1,35	2,1	Putative membrane protein, conserved in mammals
YOR204W	1,34	2,0	ATP-dependent DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)-box RNA helicase, required for translation initiation of all yeast mRNAs
YNL294C	1,34	2,1	Regulator of IME2
YBR005W	1,33	2,1	Protein of the endoplasmic reticulum membrane involved in chitin deposition in the cell wall; overproduction confers resistance to Congo Red
Q0060	1,32	2,0	Endonuclease I-SceIII, encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YOL030W	1,32	2,4	Putative 1,3-beta-glucanosyltransferase, has similarity to Gas1p; localizes to the cell wall
YLR157C-B	1,32	2,2	---
YOR248W	1,31	2,3	---
YMR171C	1,31	2,2	---
YHR132C	1,31	2,1	Non-essential protein of unknown function, similar to zinc carboxypeptidase family
YOR093C	1,31	2,1	---
YBR092C	1,31	2,5	Constitutively expressed acid phosphatase similar to Pho5p; brought to the cell surface by transport vesicles; hydrolyzes thiamin phosphates in the periplasmic space, increasing cellular thiamin uptake; expression is repressed by thiamin
YBL047C	1,31	2,5	Key endocytic protein involved in a network of interactions with other endocytic proteins, binds membranes in a ubiquitin-dependent manner, may also bind ubiquitinated membrane-associated proteins
YLR299W	1,30	2,3	Gamma-glutamyltranspeptidase, major glutathione-degrading enzyme; expression induced mainly by nitrogen starvation
YNL271C	1,30	2,5	Formin, nucleates the formation of linear actin filaments, involved in cell processes such as budding and mitotic spindle orientation which require the formation of polarized actin cables, functionally redundant with BNR1
YKR046C	1,28	2,3	Protein of unknown function that co-purifies with lipid particles; expression pattern suggests a role in respiratory growth; computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a role in ATP/ADP exchange
YOR348C	1,28	2,0	proline-specific permease (also capable of transporting alanine and glycine); putative proline-specific permease
YPL107W	1,28	2,1	---
YGR025W	1,28	2,1	---
YNL296W	1,27	2,4	---
YMR169C	1,27	2,3	Aldehyde dehydrogenase that uses NAD ⁺ as the preferred coenzyme; expression is induced in response to heat shock, oxidative, and osmotic stress
YLL048C	1,26	2,3	Bile transporter of the ATP-binding cassette (ABC) family; has similarity to a mammalian bile transporter
YEL039C	1,25	2,2	Cytochrome c isoform 2, expressed under hypoxic conditions; electron carrier of the mitochondrial intermembrane space that transfers electrons from ubiquinone-cytochrome c oxidoreductase to cytochrome c oxidase during cellular respiration
YHL044W	1,25	2,1	---
YKL172W	1,24	2,0	Essential protein required for the maturation of 25S rRNA and 60S ribosomal subunit assembly, localizes to the nucleolus
YKL054C	1,24	2,1	RNAPII degradation factor, forms a complex with Rad26p in chromatin, enables ubiquitination and proteolysis of RNAPII

YHR214C-B	1,23	2,0	---
YER098W	1,23	2,2	Ubiquitin-specific protease that cleaves ubiquitin-protein fusions
YDR483W	1,22	2,0	Alpha1,2-mannosyltransferase of the Golgi involved in protein mannosylation
YOR316C	1,22	2,2	Vacuolar transporter that mediates zinc transport into the vacuole; overexpression confers resistance to cobalt and rhodium
YOL136C	1,20	2,1	6-phosphofructo-2-kinase, has negligible fructose-2,6-bisphosphatase activity, inhibited by phosphoenolpyruvate and sn-glycerol 3-phosphate, expression induced by glucose and sucrose, transcriptional regulation involves protein kinase A
YHR079C	1,19	2,0	Serine-threonine kinase and endoribonuclease; transmembrane protein that initiates the unfolded protein response signal by regulating synthesis of Hac1p through HAC1 mRNA splicing
YHR014W	1,18	2,0	Meiosis-specific protein of unknown function, involved in maintaining sister chromatid cohesion during meiosis I as well as promoting proper attachment of kinetochores to the spindle during meiosis I and meiosis II
YML059C	1,18	2,2	Serine esterase that deacylates exogenous lysophospholipids, homolog of human neuropathy target esterase (NTE); mammalian NTE1 deacylates phosphatidylcholine to glycerophosphocholine
YDR293C	1,18	2,0	Protein with a role in maintenance of cellular integrity, interacts with components of the TOR pathway; ssd1 mutant of a clinical <i>S. cerevisiae</i> strain displays elevated virulence
YLR194C	1,17	2,1	---
YDR496C	1,17	2,0	member of the PUF protein family; YDR496C
YOR344C	1,16	2,3	may be involved in glycolytic gene expression; TYE7, a 33 kDa serine-rich protein, is a potential member of the basic region/helix-loop-helix/leucine-zipper protein family
YIL155C	1,16	2,0	Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase; expression is repressed by both glucose and cAMP and derepressed by non-fermentable carbon sources in a Snf1p, Rsf1p, Hap2/3/4/5 complex dependent manner
YNR004W	1,16	2,0	---
YNL176C	1,15	2,3	---
YPR024W	1,13	2,0	Mitochondrial inner membrane protease of the AAA family, responsible for degradation of unfolded or misfolded mitochondrial gene products; mutation causes an elevated rate of mitochondrial turnover
YDR299W	1,12	2,2	Essential protein possibly involved in secretion; multicopy suppressor of sensitivity to Brefeldin A
YMR129W	1,12	2,1	May be involved in duplication of nuclear pores and nuclear pore complexes during S-phase; Nuclear pore membrane glycoprotein
YLR332W	1,12	2,0	Protein required for mating
YLR211C	1,12	2,2	---
YDL035C	1,12	2,0	Plasma membrane G-protein coupled receptor that interacts with the heterotrimeric G protein alpha subunit, Gpa2p, and with Plc1p; sensor that integrates nutritional signals with the modulation of cell fate via PKA and cAMP synthesis
YMR238W	1,09	2,0	Mannosidase, essential glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein required for cell wall biogenesis, involved in filamentous growth, homologous to Dcw1p
YPL255W	1,08	2,3	Protein required for the spindle pole body (SPB) duplication, localized at the central plaque periphery; forms a complex with a nuclear envelope protein Mps2p and SPB components Spc29p and Kar1p; required for mitotic functions of Cdc5p
YIL159W	1,07	2,3	Formin, nucleates the formation of linear actin filaments, involved in cell processes such as budding and mitotic spindle orientation which require the formation of polarized actin cables, functionally redundant with BNI1
YDR111C	1,07	2,0	putative alanine transaminase (glutamyl pyruvic transaminase)
YKL125W	1,06	2,2	Required for transcription of rDNA by RNA Polymerase I; DNA-independent RNA Polymerase I transcription factor
YLR430W	1,06	2,1	Nuclear protein, putative helicase required for processing of tRNAs, rRNAs, and small nuclear RNAs; potential Cdc28p substrate
YKR067W	1,02	2,1	Glycerol-3-phosphate acyltransferase located in both lipid particles and the ER; involved in the stepwise acylation of glycerol-3-phosphate and dihydroxyacetone, which are intermediate steps in lipid biosynthesis
YPL065W	-1,00	-2,0	Component of the ESCRT-I complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome; involved in transport of precursors for soluble vacuolar hydrolases from the late endosome to the vacuole
YJR104C	-1,02	-2,1	Cu, Zn superoxide dismutase; some mutations are analogous to those that cause ALS (amyotrophic lateral sclerosis) in humans
YHR029C	-1,02	-2,3	---
YPL274W	-1,03	-2,0	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YMR090W	-1,04	-2,2	---
YAR071W	-1,05	-2,0	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YOR236W	-1,05	-2,2	Dihydrofolate reductase, part of the dTTP biosynthetic pathway, involved in folate metabolism, possibly required for mitochondrial function
YBR052C	-1,05	-2,1	---
YNL002C	-1,07	-2,1	Significant sequence similarity to RPL7B, but neither can functionally replace the other. Does not correspond to any ribosomal component identified so far, based on its biochemical features; Protein with similarity to ribosomal proteins including Rpl6p
YMR009W	-1,07	-2,4	---
YER067W	-1,07	-2,1	---

YMR006C	-1,11	-2,5	Phospholipase B 2; lysophospholipase/phospholipase B
YOR230W	-1,15	-2,2	WD repeat containing transcriptional modulator 1; Transcriptional modulator
YHR215W	-1,15	-2,2	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YKL103C	-1,16	-2,4	Vacuolar aminopeptidase, often used as a marker protein in studies of autophagy and cytosol to vacuole targeting (CVT) pathway
YJR074W	-1,17	-2,4	Conserved nuclear protein that interacts with GTP-Gsp1p, which is a Ran homolog of the Ras GTPase family, and stimulates nucleotide release, involved in nuclear protein import, nucleotide release is inhibited by Yrb1p
YER081W	-1,19	-2,5	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser33p
YNL067W	-1,20	-2,6	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl9Ap and has similarity to E. coli L6 and rat L9 ribosomal proteins
YML131W	-1,21	-2,7	---
YMR173W	-1,23	-2,7	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; contains multiple repeats of the amino acid sequence NNNDYGS
YDR154C	-1,26	-2,6	---
YBR191W-A	-1,26	-2,5	---
YHR137W	-1,32	-2,5	Aromatic aminotransferase, catalyzes the first step of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine catabolism
YML122C	-1,32	-2,6	---
YEL059C-A	-1,36	-2,6	Protein whose overexpression suppresses the imp1 mutation, may be required for the function of the Imp1p mitochondrial inner membrane peptidase and/or the protein sorting machinery
YCR096C	-1,39	-3,0	Silenced copy of A2, encoding a protein of with similarity to Alpha2p that is required along with A1p for inhibiting expression of the HO endonuclease in a/alpha HO/HO diploid cells with an active mating-type interconversion system
YDR380W	-1,47	-2,8	Phenylpyruvate decarboxylase, catalyzes decarboxylation of phenylpyruvate to phenylacetaldehyde, which is the first specific step in the Ehrlich pathway
YOL151W	-1,48	-2,9	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YML116W	-1,56	-3,4	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily, required for resistance to aminotriazole and 4-nitroquinoline-N-oxide
YDL124W	-1,65	-3,6	---
YDR533C	-1,68	-3,2	Possible chaperone and cysteine protease with similarity to E. coli Hsp31 and S. cerevisiae Hsp32p, Hsp33p, and Sno4p; member of the DJ-1/ThiJ/Pfpl superfamily, which includes human DJ-1 involved in Parkinson's disease; exists as a dimer
YLR303W	-1,90	-3,8	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YFL056C	-1,92	-3,7	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YNL134C	-2,08	-4,0	---
YLR040C	-2,47	-5,3	---
YDL130W	-2,81	-5,3	Ribosomal protein P1 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YJR148W	-2,84	-5,5	Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase, homolog of murine ECA39; highly expressed during stationary phase and repressed during logarithmic phase
YJL217W	-3,33	-7,3	---
YPL187W	-4,08	-7,8	mating factor alpha
YOL039W	-4,10	-7,5	Ribosomal protein P2 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YGL089C	-4,86	-10,2	alpha mating factor

Tabla A.9. Resultados del análisis de transcriptoma de D57/W303 hibridado en microarrays de oligonucleótidos YG1.1. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

Orf	LogT	zs	Description
Q0070	6,51	8,3	Endonuclease I-SceIV, involved in intron mobility; encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
Q0075	5,25	6,8	Protein of unknown function, encoded within an intron of the mitochondrial COX1 gene; translational initiation codon is predicted to be ATA rather than ATG
YFL026W	3,67	4,7	alpha-factor pheromone receptor; seven-transmembrane domain protein
Q0110	3,49	6,3	Mitochondrial mRNA maturase with a role in splicing, encoded by both exon and intron sequences of partially processed COB mRNA
YNL145W	3,44	4,0	lipopeptide mating pheromone; mating a-factor pheromone precursor
Q0060	3,26	4,1	Endonuclease I-SceIII, encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YDR461W	2,81	3,5	a-factor mating pheromone precursor
YPR204W	2,75	3,7	---
YIL177C	2,21	3,1	---
YML031W	2,20	3,4	Nuclear envelope protein required for meiosis II, dispensable for mitotic spindle pole body

			duplication but required for insertion of nascent spindle pole bodies into the nuclear envelope; ndc1 parental spindle pole bodies form monopolar spindles in mitosis
YLR414C	2,18	2,8	---
Q0160	2,16	2,4	I-SceI DNA endonuclease encoded by mitochondrial 21S rRNA gene intron
YCL064C	2,15	3,8	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YGR189C	2,08	2,9	Putative glycosidase of the cell wall, may have a role in cell wall architecture
Q0065	2,03	2,6	Endonuclease I-SceII, encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene; intron is normally spliced by the Bl4p maturase but Al4p can mutate to acquire the same maturase activity
YAL055W	2,01	4,1	Putative peroxisomal membrane protein required for import of peroxisomal proteins, functionally complements a <i>Pichia pastoris</i> pex22 mutation
YOR202W	1,99	3,5	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YML016C	1,98	2,6	Serine/threonine protein phosphatase Z, isoform of Ppz2p; involved in regulation of potassium transport, which affects osmotic stability, cell cycle progression, and halotolerance
YLL021W	1,97	3,0	Component of the polarisome, which functions in actin cytoskeletal organization during polarized growth; acts as a scaffold for Mkk1p and Mpk1p cell wall integrity signaling components; potential Cdc28p substrate
YNL147W	1,93	2,3	Component of small nuclear ribonucleoprotein complexes involved in RNA processing, splicing, and decay
YJL225C	1,88	2,3	---
YOL103W	1,86	2,4	Myo-inositol transporter with strong similarity to the major myo-inositol transporter Itr1p, member of the sugar transporter superfamily; expressed constitutively
YMR298W	1,86	2,4	---
YNL030W	1,79	2,8	One of two identical histone H4 proteins (see also HHF1); core histone required for chromatin assembly and chromosome function; contributes to telomeric silencing; N-terminal domain involved in maintaining genomic integrity
YPL283C	1,75	2,1	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YDR545W	1,75	2,4	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YCR037C	1,69	2,6	Low-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter, involved in activation of PHO pathway; expression is independent of Pi concentration and Pho4p activity; contains 12 membrane-spanning segments
YNL339C	1,68	2,0	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YKL209C	1,68	4,0	ABC transporter, glycoprotein, component of a-factor secretory pathway
YOR396W	1,67	2,0	---
YGR094W	1,62	2,2	mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA synthetase
YCR097W	1,61	3,8	Silenced copy of A1, encoding a homeobox-domain containing corepressor that interacts with Alpha2p to repress haploid-specific gene transcription in diploid cells
YBL085W	1,61	2,4	Protein implicated in polar growth, functionally redundant with Boi2p; interacts with bud-emergence protein Bem1p; contains an SH3 (src homology 3) domain and a PH (pleckstrin homology) domain
Q0140	1,61	2,0	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, mitochondrially-encoded; polymorphic in different strains due to variation in number of AAT (asparagine) codons; translated near the mitochondrial inner membrane
YOR167C	1,60	2,4	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps28Ap and has similarity to rat S28 ribosomal protein
YGL106W	1,60	2,1	Essential light chain for Myo1p; may stabilize Myo2p by binding to the neck region; may interact with Myo1p, Iqg1p, and Myo2p to coordinate the formation and contraction of the actomyosin ring with targeted membrane deposition; light chain for myosin Myo2p
YKL034W	1,58	2,3	Transmembrane Ubiquitin Ligase
YLR057W	1,55	2,2	---
YCR093W	1,53	2,0	Component of the CCR4-NOT complex, which has multiple roles in regulating mRNA levels including regulation of transcription and destabilizing mRNAs by deadenylation; basal transcription factor
YNL283C	1,49	2,2	cell wall integrity and stress response component 2; Putative integral membrane protein containing novel cysteine motif. Similarity to SLG1 (WSC1), WSC3 and WSC4
YKR024C	1,48	2,5	Putative ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family involved in ribosomal biogenesis
YIL063C	1,48	2,5	Ran-GTPase-binding protein involved in nuclear export; nuclear protein, interacts with Gsp1p and Crm1p
YER099C	1,46	2,4	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase, involved in nucleotide, histidine, and tryptophan biosynthesis; one of a five related enzymes, which are active as heteromultimeric complexes
YGL032C	1,45	2,2	Adhesion subunit of a-agglutinin of a-cells, C-terminal sequence acts as a ligand for alpha-agglutinin (Sag1p) during agglutination, modified with O-linked oligomannosyl chains, linked to anchorage subunit Aga1p via two disulfide bonds
YKL110C	1,44	2,9	Protein associated with the RNA polymerase II Elongator complex; involved in sensitivity to G1 arrest induced by <i>Kluyveromyces lactis</i> toxin, zymocin
YLR298C	1,44	3,2	U1 snRNP protein required for pre-mRNA splicing
YOL038W	1,43	2,3	20S proteasome alpha-type subunit

YNL087W	1,43	2,6	Bud-specific protein with a potential role in membrane trafficking; GFP-fusion protein migrates from the cell surface to intracellular vesicles near vacuole; contains 3 calcium and lipid binding domains; mRNA is targeted to the bud via the mRNA transport system involving She2p
YMR013C	1,39	2,6	Membrane protein that catalyzes the CTP-mediated phosphorylation of dolichol, the terminal step in dolichyl monophosphate (Dol-P) biosynthesis; required for viability, normal rates of lipid intermediate synthesis, and protein N-glycosylation
YLR438C-A	1,39	2,4	Component of small nuclear ribonucleoprotein complexes involved in RNA processing, splicing, and decay
YOR194C	1,38	2,7	Transcription factor IIA, large chain
YER151C	1,37	2,7	Ubiquitin-specific protease that interacts with Bre5p to co-regulate anterograde and retrograde transport between endoplasmic reticulum and Golgi compartments; inhibitor of gene silencing; cleaves ubiquitin fusions but not polyubiquitin
YMR287C	1,37	2,0	RNase, component of the mitochondrial degradosome along with the ATP-dependent RNA helicase Suv3p; the degradosome associates with the ribosome and mediates turnover of aberrant or unprocessed RNAs
YML053C	1,35	2,3	---
YDL089W	1,32	2,3	---
YDR275W	1,29	2,3	Protein of unknown function, ORF exhibits genomic organization compatible with a translational readthrough-dependent mode of expression
YPR046W	1,27	2,7	Protein involved in kinetochore-microtubule mediated chromosome segregation; binds to centromere DNA
YNL004W	1,26	2,2	Poly(A+) RNA-binding protein, involved in the export of mRNAs from the nucleus to the cytoplasm; similar to Gbp2p and Npl3p
YPR137W	1,26	2,1	part of small (ribosomal) subunit (SSU) processosome (contains U3 snoRNA); Rrp9p is an ortholog of the human U3-55k protein; the human cDNA partially complements a yeast rrp9 null mutant. (Pluk et al. (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 488-498.); U3 small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein involved in pre-ribosomal RNA processing.
YJR005W	1,25	2,5	beta-adaptin, large subunit of the clathrin-associated protein complex
YKR038C	1,24	2,5	Putative glycoprotease that interacts with Bud32p, which is a member of the novel protein kinase piD261 family
YJR127C	1,24	3,1	Zinc-finger protein that localizes to the nucleus, putative transcriptional regulator of ALD6
YBR155W	1,23	2,4	cyclophilin seven suppressor; component of Hsp90p chaperone machinery
YNL076W	1,21	2,9	Pleiotropic regulatory factor involved in Ras-CAMP and lysine biosynthetic pathways and nitrogen regulation; negative regulator of Ras cAMP pathway, shares weak homology with Spt2p
YDL056W	1,20	2,4	Transcription factor involved in regulation of cell cycle progression from G1 to S phase, forms a complex with Swi6p that binds to Mlul cell cycle box regulatory element in promoters of DNA synthesis genes
YJR046W	1,19	2,4	DNA replication licensing factor, required for pre-replication complex assembly
YNL166C	1,19	2,6	Protein involved in organization of septins at the mother-bud neck, may interact directly with the Cdc11p septin, localizes to bud neck in a septin-dependent manner
YPR082C	1,18	2,0	17-kDa component of the U4/U6aU5 tri-snRNP, plays an essential role in pre-mRNA splicing, orthologue of the human U5-specific 15-kDa protein
YMR078C	1,17	2,4	Subunit of a complex with Ctf8p that shares some subunits with Replication Factor C and is required for sister chromatid cohesion; may have overlapping functions with Rad24p in the DNA damage replication checkpoint
YBL007C	1,17	2,1	Cytoskeletal protein binding protein required for assembly of the cortical actin cytoskeleton; contains 3 SH3 domains; interacts with proteins regulating actin dynamics and with proteins required for endocytosis
YCL051W	1,17	2,2	Protein involved in control of cell wall structure and stress response; inhibits Cbk1p protein kinase activity; overproduction confers resistance to cell-wall degrading enzymes
Q0055	1,16	2,3	Reverse transcriptase required for splicing of the COX1 pre-mRNA, encoded by a mobile group II intron within the mitochondrial COX1 gene
YGL151W	1,15	2,3	Component of the RNA polymerase II mediator complex, which is required for transcriptional activation and also has a role in basal transcription
YOR216C	1,15	2,7	Golgi matrix protein that is involved in the structural organization of the cis-Golgi
YBR217W	1,15	2,2	Protein that becomes conjugated to Atg5p by the E1 enzyme Atg7p, a step that is essential for autophagy
YNL231C	1,14	2,2	Phosphatidylinositol transfer protein (PITP) controlled by the multiple drug resistance regulator Pdr1p, localizes to lipid particles and microsomes, controls levels of various lipids, may regulate lipid synthesis, homologous to Pdr17p
YOR102W	1,14	2,8	---
YCL021W-A	1,14	2,8	---
YLR318W	1,12	2,8	Reverse transcriptase subunit of the telomerase holoenzyme, essential for telomerase core catalytic activity, involved in other aspects of telomerase assembly and function
YOR160W	1,11	2,3	Nuclear import receptor, mediates the nuclear localization of proteins involved in mRNA-nucleus export
YDR497C	1,11	2,3	Myo-inositol transporter with strong similarity to the minor myo-inositol transporter Itr2p, member of the sugar transporter superfamily; expression is repressed by inositol and choline via Opi1p and derepressed via Ino2p and Ino4p
YER008C	1,09	2,0	Non-essential subunit of the exocyst complex (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p, Exo84p) which mediates targeting of post-Golgi vesicles to sites of active exocytosis; Sec3p specifically is a spatial landmark for secretion
YOL072W	1,09	2,0	Nuclear pore-associated protein, forms a complex with Sac3p that is involved in transcription and in mRNA export from the nucleus; contains a PAM domain implicated in protein-protein binding

Q0143	1,09	2,7	---
YPR129W	1,07	2,2	Protein containing an Lsm domain, may bind RNA and have a role in RNA processing; overproduction suppresses a null mutation in CHC1, which encodes the heavy chain of clathrin
YGR243W	1,06	2,2	The authentic, non-tagged protein was localized to mitochondria
YPR029C	1,05	2,2	Gamma-adaptin, large subunit of the clathrin-associated protein (AP) complex
YLR345W	1,05	2,1	---
YER128W	1,02	2,1	---
YER059W	1,01	2,1	Pho85p cyclin of the Pho80p subfamily; forms the major Glc8p kinase together with Pcl7p and Pho85p; involved in the control of glycogen storage by Pho85p; stabilized by Elongin C binding
YCR012W	-1,05	-2,1	3-phosphoglycerate kinase
YKL056C	-1,19	-2,0	Hypothetical ORF
YER073W	-1,43	-2,0	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase that is activated by K ⁺ and utilizes NADP ⁺ as the preferred coenzyme
YML126C	-1,45	-2,1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase, catalyzes the formation of HMG-CoA from acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA; involved in the second step in mevalonate biosynthesis
YPR024W	-1,50	-2,0	Mitochondrial inner membrane protease of the AAA family, responsible for degradation of unfolded or misfolded mitochondrial gene products; mutation causes an elevated rate of mitochondrial turnover
YKL033W-A	-1,53	-2,2	---
YLR378C	-1,53	-2,0	membrane component of ER protein translocation apparatus
YPR048W	-1,53	-2,0	Protein with a potential role in DNA replication; displays synthetic lethal genetic interaction with the pol3-13 allele of POL3, which encodes DNA polymerase delta
YNR001C	-1,54	-2,1	Citrate synthase, catalyzes the condensation of acetyl coenzyme A and oxaloacetate to form citrate; the rate-limiting enzyme of the TCA cycle; nuclear encoded mitochondrial protein
YNL241C	-1,59	-2,1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
YML123C	-1,60	-2,1	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YER081W	-1,62	-2,2	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser33p
YDR154C	-1,63	-2,1	---
YNL016W	-1,64	-2,1	Poly(A) ⁺ RNA-binding protein, abundant mRNP-component protein hypothesized to bind a pool of non-translatable mRNAs; not reported to associate with polyribosomes
YER037W	-1,64	-2,1	Protein of unknown function, expression is induced by low phosphate levels and by inactivation of Pho85p
YHR215W	-1,66	-2,1	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; nearly identical to Pho11p; upregulated by phosphate starvation
YNL146W	-1,68	-2,3	---
YMR294W-A	-1,69	-2,3	---
YPR114W	-1,70	-2,2	---
YPR181C	-1,71	-2,2	cytoplasmic GTPase-activating protein
YMR292W	-1,71	-2,3	Golgi Transport; membrane protein
YPL140C	-1,72	-2,3	Member of MAP kinase pathway involving PKC1, BCK1, and SLT2. Shows functional redundancy with MKK1; protein kinase
YJL012C-A	-1,73	-2,3	---
YNL130C	-1,84	-2,4	Cholinephosphotransferase, required for phosphatidylcholine biosynthesis and for inositol-dependent regulation of EPT1 transcription
YGL009C	-1,86	-2,4	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YDR380W	-1,87	-2,4	Phenylpyruvate decarboxylase, catalyzes decarboxylation of phenylpyruvate to phenylacetaldehyde, which is the first specific step in the Ehrlich pathway
YML110C	-1,87	-2,6	2-hexaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone methyltransferase, involved in ubiquinone (Coenzyme Q) biosynthesis; located in mitochondria
YOR230W	-1,89	-2,4	WD repeat containing transcriptional modulator 1; Transcriptional modulator
YOR359W	-1,89	-2,0	---
YLR040C	-1,91	-2,5	---
YLR382C	-1,93	-2,1	Mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, also has a direct role in splicing of several mitochondrial group I introns; indirectly required for mitochondrial genome maintenance
YML002W	-1,96	-2,2	---
YBR132C	-1,96	-2,0	Plasma membrane carnitine transporter, expression is down-regulated by osmotic stress; also functions as a low-affinity amino acid permease
YNL052W	-1,97	-2,7	Subunit Va of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; predominantly expressed during aerobic growth while its isoform Vb (Cox5Bp) is expressed during anaerobic growth
YPL078C	-1,99	-2,6	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YCR092C	-2,03	-2,7	Mismatch repair protein, forms dimers with Msh2p that mediate repair of insertion or deletion mutations and removal of nonhomologous DNA ends, contains a PCNA (Pol30p) binding motif required for genome stability
YMR193C-A	-2,04	-2,6	---
YOR385W	-2,07	-2,7	---
YKR093W	-2,11	-2,8	Functions in transport of small peptides into the cell; Peptide transporter

YJR004C	-2,15	-2,8	Alpha-agglutinin of alpha-cells, binds to Aga1p during agglutination, N-terminal half is homologous to the immunoglobulin superfamily and contains binding site for a-agglutinin, C-terminal half is highly glycosylated and contains GPI anchor
YLL005C	-2,20	-2,0	Meiosis-specific protein of unknown function, required for spore wall formation during sporulation; dispensible for both nuclear divisions during meiosis
YLL039C	-2,24	-2,9	Ubiquitin, becomes conjugated to proteins, marking them for selective degradation via the ubiquitin-26S proteasome system; essential for the cellular stress response
YJL012C	-2,26	-2,9	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YMR118C	-2,29	-2,1	---
YOR002W	-2,32	-2,1	Glucosyltransferase, involved in transfer of oligosaccharides from dolichyl pyrophosphate to asparagine residues of proteins during N-linked protein glycosylation; mutations in human ortholog are associated with disease
YLR035C-A	-2,34	-3,1	---
YNL025C	-2,35	-3,2	Component of RNA polymerase II holoenzyme, involved in RNA pol II carboxy-terminal domain phosphorylation
YPL054W	-2,37	-2,1	Protein of unknown function
YOR041C	-2,37	-2,1	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 85% of ORF overlaps the uncharacterized gene CUE5; deletion in <i>cyr1</i> mutant results in loss of stress resistance
YLR434C	-2,41	-2,0	---
YKL096W	-2,41	-2,1	Cell wall mannoprotein, acceptor of B1-6 glucan; involved in O and N glycosylation
YKL111C	-2,41	-2,2	---
YNL156C	-2,42	-3,0	Protein of unknown function, potential homolog of mammalian Insig 1
YPR168W	-2,42	-2,2	Component of the RNA polymerase II mediator complex, which is required for transcriptional activation and also has a role in basal transcription
YLR189C	-2,45	-2,2	Udp-glycosyltransferase; UDP-glucose:sterol glucosyltransferase
YOL046C	-2,45	-2,0	---
YGR064W	-2,45	-2,2	---
YPL110C	-2,46	-2,1	---
YER039C	-2,47	-2,1	Protein of unknown function, has homology to Vrg4p
YML003W	-2,48	-2,2	---
YFR038W	-2,53	-2,3	---
YLR004C	-2,53	-2,2	---
YFR042W	-2,55	-2,1	---
YOL120C	-2,58	-3,2	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, identical to Rpl18Bp and has similarity to rat L18 ribosomal protein; intron of RPL18A pre-mRNA forms stem-loop structures that are a target for Rnt1p cleavage leading to degradation
YKL178C	-2,58	-3,4	Cell surface a factor receptor, transcribed in alpha cells and required for mating by alpha cells, couples to a MAP kinase cascade to mediate pheromone response; ligand bound receptors undergo endocytosis and recycling to the plasma membrane
YNL321W	-2,60	-2,0	---
YOR029W	-2,60	-2,2	---
YNL268W	-2,62	-3,0	Lysine permease; one of three amino acid permeases (Alp1p, Can1p, Lyp1p) responsible for uptake of cationic amino acids
YMR158W-A	-2,66	-3,6	---
YMR110C	-2,71	-2,1	---
YMR245W	-2,78	-3,6	---
YAR071W	-2,81	-3,6	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YNL203C	-2,84	-2,2	---
YDR022C	-2,86	-2,0	Protein involved in microtubule assembly
YPR147C	-2,86	-2,0	---
YNL307C	-2,86	-2,2	Protein serine/threonine/tyrosine (dual-specificity) kinase involved in control of chromosome segregation and in regulating entry into meiosis; related to mammalian glycogen synthase kinases of the GSK-3 family
YKL136W	-2,87	-2,2	---
YPR038W	-2,88	-2,0	---
YPL282C	-2,91	-2,2	---
YDL123W	-2,92	-2,0	Protein of unknown function, localized to the vacuolar outer membrane
YPR087W	-2,92	-2,5	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 85% of ORF overlaps the verified gene SRP54; deletion causes a vacuolar protein sorting defect
YAR027W	-2,93	-2,2	Putative integral membrane protein of unknown function; interacts with Ulp1p at the nuclear periphery; member of DUP240 gene family
YFL012W-A	-2,95	-2,0	---
YOL037C	-2,95	-2,1	---
YNL202W	-2,96	-2,0	late sporulation specific gene which may function during spore wall formation; peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase

YFR054C	-2,98	-2,0	---
YML117W-A	-2,98	-2,0	---
YDR536W	-2,99	-2,2	sugar transporter-like protein
YPR012W	-3,00	-2,4	---
YPL035C	-3,03	-2,3	---
YDR209C	-3,05	-2,0	---
YGL077C	-3,06	-2,3	Choline transporter (permease) that also controls the uptake of nitrogen mustard; expression is co-regulated with phospholipid biosynthetic genes and negatively regulated by choline and myo-inositol
YKL065C	-3,06	-2,1	Endoplasmic reticulum transmembrane protein, homolog of human BAP31 protein
YOR072W	-3,08	-2,3	---
YOR292C	-3,08	-2,5	---
YCR097W-A	-3,09	-2,0	---
YPR099C	-3,12	-2,3	---
YNL336W	-3,13	-2,0	Protein of unknown function, member of a family of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YLR237W	-3,17	-2,0	Plasma membrane transporter responsible for the uptake of thiamine, member of the major facilitator superfamily of transporters; mutation of human ortholog causes thiamine-responsive megaloblastic anemia
YFL052W	-3,17	-2,8	---
YDL245C	-3,18	-2,0	Protein of unknown function with similarity to hexose transporter family members, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
YOR218C	-3,19	-2,7	---
YOR082C	-3,20	-2,0	---
YPR183W	-3,21	-3,5	Dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) synthase of the ER membrane, catalyzes the formation of Dol-P-Man from Dol-P and GDP-Man; required for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and protein glycosylation
YMR135W-A	-3,22	-2,1	---
YKR028W	-3,23	-2,0	Protein that forms a complex with the Sit4p protein phosphatase and is required for its function; member of a family of similar proteins including Sap4p, Sap155p, and Sap185p
YHR130C	-3,26	-2,0	---
YKL118W	-3,27	-2,2	---
YDR509W	-3,27	-2,0	---
YKL165C	-3,28	-2,5	Protein involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor synthesis; multimembrane-spanning protein that localizes to the endoplasmic reticulum; highly conserved among eukaryotes
YOR015W	-3,28	-2,4	---
YPL076W	-3,30	-2,3	Protein involved in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol (GlcNAc-PI), the first intermediate in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors; homologous to the human PIG-C protein
YDR411C	-3,30	-2,9	Der1p like family member; localizes to the ER, contains four transmembrane domains
YDL172C	-3,30	-2,0	---
YOR146W	-3,31	-2,1	---
YPL019C	-3,32	-4,4	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YLR169W	-3,32	-2,7	---
YDR187C	-3,33	-2,0	---
YIL054W	-3,33	-2,0	---
YDL185C-A	-3,33	-2,1	---
YNL228W	-3,33	-2,3	---
YMR272C	-3,34	-4,3	Required for the hydroxylation of the very long chain fatty acid (VLCFA), located in the endoplasmic reticulum; desaturase/hydroxylase enzyme
YLL020C	-3,34	-3,9	---
YPR150W	-3,35	-2,1	---
YAR047C	-3,35	-2,6	---
YDR230W	-3,36	-2,0	---
YLR428C	-3,36	-2,5	---
YMR304C-A	-3,37	-2,3	---
YGL098W	-3,37	-2,1	Use1p is a SNARE and forms a complex with the SNAREs Sec22p, Sec20p and Ufe1p. The protein is localized to the ER and use1 mutants show defects in retrograde traffic from the Golgi to the ER; Protein required for cell viability
YKL044W	-3,39	-2,0	---
YBR247C	-3,39	-2,1	Protein associated with U3 and U14 snoRNAs, required for pre-rRNA processing and 40S ribosomal subunit synthesis; localized in the nucleus and concentrated in the nucleolus
YKL202W	-3,40	-4,2	---
YPL265W	-3,41	-2,1	Dicarboxylic amino acid permease, mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate; also a transporter for Gln, Asn, Ser, Ala, and Gly
YLR311C	-3,41	-2,2	---
YLR404W	-3,42	-2,1	---

YGR115C	-3,42	-2,1	---
YGL263W	-3,43	-2,5	Protein of unknown function, member of a family of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YPL261C	-3,43	-2,1	---
YMR086C-A	-3,44	-2,1	---
YKL083W	-3,44	-2,1	---
YPR170C	-3,45	-2,2	---
YDR535C	-3,46	-2,2	---
YGR038W	-3,49	-4,4	Evolutionarily conserved protein with similarity to Orm2p, required for resistance to agents that induce the unfolded protein response; human ortholog is located in the endoplasmic reticulum
YBR224W	-3,57	-2,4	---
YNL179C	-3,58	-2,5	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; deletion in <i>cyr1</i> mutant results in loss of stress resistance
YML090W	-3,59	-2,6	---
YPL130W	-3,59	-2,0	Meiosis-specific protein of unknown function, involved in completion of nuclear divisions; identified as a weak high-copy suppressor of the <i>spo1-1</i> ts mutation; putative GPI-dependent cell-wall protein
YDR382W	-3,60	-4,1	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YDR413C	-3,61	-2,3	---
YBL042C	-3,62	-2,3	High affinity uridine permease, localized to the plasma membrane; not involved in uracil transport
YPL036W	-3,63	-2,5	plasma membrane ATPase
YNL326C	-3,63	-2,0	Palmitoyltransferase for Vac8p, one of three yeast DHHC-cysteine rich domain proteins (Pfa3p, Erf2p, Akr1p) with palmitoyltransferase activity; required for vacuolar integrity under stress conditions
YPR142C	-3,66	-3,2	---
YML089C	-3,68	-2,4	---
YDL041W	-3,71	-2,6	---
YFR057W	-3,73	-2,3	---
YOR365C	-3,84	-2,4	---
YNL324W	-3,85	-2,5	---
YOR053W	-3,90	-2,4	---
YPL187W	-3,92	-4,6	mating factor alpha
YPR126C	-4,02	-2,6	---
YPL056C	-4,13	-2,5	---
YGL089C	-4,26	-4,9	alpha mating factor
YDL081C	-4,65	-7,7	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component

Tabla A.10. Resultados del análisis de traductoma de D57/W303 hibridado en microarrays de oligonucleótidos YG1.1. LogT: Logaritmo de la relación de expresión génica D4567/W303. zs: Valor estadístico de significancia obtenido por z-score.

Orf	LogT	zs	Description
YER138C	1,71	2,2	---
YDL081C	-4,12	-6,9	Ribosomal protein P1 alpha, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component
YNL284C-B	1,73	2,2	---
YAR009C	1,68	2,2	---
YOL103W-B	1,74	2,2	---
YML039W	1,61	2,1	---
YPL257W-B	1,69	2,2	---
YJR029W	1,67	2,2	---
YGR027W-B	1,67	2,2	---
YDR382W	-3,99	-5,9	Ribosomal protein P2 beta, a component of the ribosomal stalk, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; regulates the accumulation of P1 (Rpp1Ap and Rpp1Bp) in the cytoplasm
YER160C	1,60	2,1	---
YBL005W-B	1,59	2,1	---
YPR158C-D	1,50	2,1	---
YBR012W-B	1,54	2,2	---
YLR035C-A	1,50	2,1	---
YDR316W-B	1,54	2,2	---
YER072W	-1,77	-2,4	Protein involved in vacuolar maintenance
YGR161C-D	1,49	2,1	---
YPR158W-B	1,39	2,0	---
YML045W	1,42	2,1	---

YOR142W-B	1,46	2,2	---
YGL009C	-1,53	-2,0	Isopropylmalate isomerase, catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
YGL089C	-4,24	-5,5	alpha mating factor
YPL187W	-3,96	-5,2	mating factor alpha
YAR071W	-2,86	-3,8	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface by the secretory pathway; induced by phosphate starvation and coordinately regulated by PHO4 and PHO2
YMR050C	1,43	2,3	---
YMR045C	1,45	2,4	---
YNL145W	3,77	6,3	lipopeptide mating pheromone; mating a-factor pheromone precursor
YFL014W	1,39	2,3	Plasma membrane localized protein that protects membranes from desiccation; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase entry, glucose depletion, oleate and alcohol; regulated by the HOG and Ras-Pka pathways
YML122C	-2,59	-3,7	---
YLR340W	-1,87	-2,7	Conserved ribosomal protein P0 similar to rat P0, human P0, and E. coli L10e; shown to be phosphorylated on serine 302
YKL120W	-1,69	-2,4	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YLR438C-A	1,16	2,0	Component of small nuclear ribonucleoprotein complexes involved in RNA processing, splicing, and decay
YDR154C	-1,67	-2,5	---
YJL012C-A	-1,66	-2,5	---
YLR157C-B	1,43	2,6	---
YOL058W	-1,50	-2,4	Argininosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
YLR303W	-1,10	-2,0	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required for sulfur amino acid synthesis
YOR202W	1,39	2,8	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, catalyzes the sixth step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control via Gcn4p
YDR380W	-2,19	-4,1	Phenylpyruvate decarboxylase, catalyzes decarboxylation of phenylpyruvate to phenylacetaldehyde, which is the first specific step in the Ehrlich pathway
YJR073C	-1,06	-2,1	Phospholipid methyltransferase (methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase), catalyzes the last two steps in phosphatidylcholine biosynthesis
YHR214C-B	1,45	3,1	---
YJL012C	-1,62	-3,3	Phosphate metabolism; transcription is regulated by PHO system; polyphosphate synthetase (putative)
YGL117W	-1,66	-3,4	---
YKL073W	-1,24	-2,6	Molecular chaperone of the endoplasmic reticulum lumen, involved in polypeptide translocation and folding; member of the Hsp70 family; localizes to the lumen of the ER; regulated by the unfolded protein response pathway
YPL274W	-1,10	-2,4	High-affinity S-adenosylmethionine permease, required for utilization of S-adenosylmethionine as a sulfur source; has similarity to S-methylmethionine permease Mmp1p
YER081W	-1,52	-3,4	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis; isozyme of Ser33p
YDL232W	-1,01	-2,3	Subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the ER lumen, which catalyzes asparagine-linked glycosylation of newly synthesized proteins; type I membrane protein of 36 residues that binds Stt3p and Ost3p together in a subcomplex
YGL215W	1,10	2,2	cyclin-like protein that interacts with Pho85p in affinity chromatography; cyclin-like protein that interacts with Pho85
YCL064C	3,48	6,9	catabolism of hydroxy amino acids; catabolic serine (threonine) dehydratase
YGL032C	4,00	7,9	Adhesion subunit of a-agglutinin of a-cells, C-terminal sequence acts as a ligand for alpha-agglutinin (Sag1p) during agglutination, modified with O-linked oligomannosyl chains, linked to anchorage subunit Aga1p via two disulfide bonds
YFL056C	-1,04	-2,5	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YBL005W-A	1,85	3,6	---
YEL059C-A	-1,32	-3,1	Protein whose overexpression suppresses the imp1 mutation, may be required for the function of the Imp1p mitochondrial inner membrane peptidase and/or the protein sorting machinery
YKL082C	1,58	2,9	Required for normal pre-rRNA Processing; Protein required for cell viability
YHR108W	-1,79	-2,6	Golgi-localized protein with homology to gamma-adaptin, interacts with and regulates Arf1p and Arf2p in a GTP-dependent manner in order to facilitate traffic through the late Golgi
YLR040C	-2,16	-2,6	---
YFL021W	-2,17	-2,5	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression, member of the GATA family of DNA binding proteins; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p
YCL017C	2,12	3,9	Required for the post-transcriptional thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs, also functions in mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis; NifS-like protein
YFL026W	3,67	6,7	alpha-factor pheromone receptor; seven-transmembrane domain protein
YDR461W	3,07	5,6	a-factor mating pheromone precursor
YNL146W	-6,16	-6,3	---
YMR110C	-5,10	-5,1	---
YOL134C	-6,84	-6,8	---
YJR079W	-5,96	-5,7	---
YMR292W	-4,87	-3,7	Golgi Transport; membrane protein
YNL296W	1,37	3,4	---
YLR106C	1,12	2,9	Midasin, pseudo-hexameric assembly of AAA protomers associated with a C-terminal MIDAS-

			containing M-domain, associated with 60S pre-ribosomes (large subunit precursor) and their export from the nucleus
YDR504C	-5,36	-2,9	Protein required for survival at high temperature during stationary phase; not required for growth on nonfermentable carbon sources
YBR169C	1,42	3,6	HSP70 family member, highly homologous to Sse1p
YOR317W	1,19	2,9	Long chain fatty acyl-CoA synthetase with a preference for C12:0-C16:0 fatty acids; involved in the activation of imported fatty acids; not required for growth on nonfermentable carbon sources; essential for stationary phase
YDR365C	1,44	3,3	Nucleolar protein involved in pre-rRNA processing; depletion causes severely decreased 18S rRNA levels
YER150W	1,15	2,7	Protein with similarity to Sed1p; strongly expressed during stationary phase, and transcription is dependent on Msn2p/Msn4p
YJR014W	1,10	2,6	Hypothetical ORF
YNR051C	1,06	2,5	Ubiquitin protease cofactor, forms deubiquitination complex with Ubp3p that coregulates anterograde and retrograde transport between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments; null is sensitive to brefeldin A
YER129W	1,11	2,7	Upstream kinase for the SNF1 complex, has partially redundant function with Elm1p and Tos3p, closest mammalian homolog is calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase beta
YCL061C	1,02	2,5	S-phase checkpoint protein found at replication forks, required for DNA replication; also required for Rad53p activation during DNA replication stress, where it forms a replication-pausing complex with Tof1p and is phosphorylated by Mec1p; protein involved in replication checkpoint
YIL144W	1,03	2,4	Highly conserved coil-coil protein, component of the Ndc80 complex at the kinetochore that functions in chromosome segregation, kinetochore assembly, and spindle checkpoint activity
YLL026W	1,12	2,5	Heat shock protein that cooperates with Ydj1p (Hsp40) and Ssa1p (Hsp70) to refold and reactivate previously denatured, aggregated proteins; responsive to stresses including: heat, ethanol, and sodium arsenite; involved in [PSI ⁺] propagation
YCL021W-A	2,30	4,1	---
YBL052C	1,11	2,2	Protein involved in silencing at HMR
YCR097W	3,00	5,1	Silenced copy of A1, encoding a homeobox-domain containing corepressor that interacts with Alpha2p to repress haploid-specific gene transcription in diploid cells
YKL046C	1,15	2,4	Mannosidase, GPI-anchored membrane protein required for cell wall biosynthesis, homologous to Dfg5p
YIL082W-A	1,21	2,5	---
YBR108W	1,03	2,3	---
YHR023W	1,15	2,3	Type II myosin heavy chain, required for wild-type cytokinesis and cell separation; localizes to the actomyosin ring; binds to myosin light chains Mlc1p and Mlc2p through its IQ1 and IQ2 motifs respectively
YDR464W	1,31	2,5	appears to control expression of spliceosome components PRP4 and PRP3; negative regulator of prp genes
YJR127C	1,32	2,4	Zinc-finger protein that localizes to the nucleus, putative transcriptional regulator of ALD6
YDR088C	1,11	2,1	Protein involved in 3' splice site choices, acts in concert with Prp18p during the 2nd step of splicing
YGL168W	1,05	2,0	Protein required for hydroxyurea resistance; functions in DNA replication
YKL209C	1,68	2,8	ABC transporter, glycoprotein, component of a-factor secretory pathway
Q0070	1,13	2,1	Endonuclease I-SceIV, involved in intron mobility; encoded by a mobile group I intron within the mitochondrial COX1 gene
YKR095W	1,07	2,0	Mlp proteins restrict telomere length by influencing the Rif1-Tel1 pathway of telomerase regulation; also involved in the translocation of macromolecules between the nucleoplasm and the NPC; coiled-coil protein (putative), similar to myosin and TPR
YKL172W	1,12	2,0	Essential protein required for the maturation of 25S rRNA and 60S ribosomal subunit assembly, localizes to the nucleolus
YBR112C	1,09	2,0	General transcriptional co-repressor, acts together with Tup1p; also acts as part of a transcriptional co-activator complex that recruits the SWI/SNF and SAGA complexes to promoters
YDR163W	1,14	2,1	Non-essential protein involved in pre-mRNA splicing, component of a complex containing Cef1p; has similarity to <i>S. pombe</i> Cwf15p
YHR218W	1,17	2,1	---
YDR128W	1,53	2,6	---
YBL086C	1,14	2,1	---
YDR363W	1,11	2,0	Protein involved in mating-type locus silencing, interacts with Sir2p; probably functions to recruit or stabilize Sir proteins
YDL139C	1,52	2,7	Suppressor of chromosome missegregation
YLL008W	1,09	2,1	Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits